

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**



**TESIS DOCTORAL**

**Modificaciones funcionales y estructurales en el aparato  
genital de la oveja, sometida al control de los ciclos sexuales  
con el sistema P.G.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**Josefina María Illera del Portal**

DIRECTOR:

**Tomás Pérez García**

**Madrid, 2015**

Josefina María Illera del Portal

TP  
1982

142



\* 5 3 0 9 8 5 8 8 8 3 \*

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

X-53-080194-2

MODIFICACIONES FUNCIONALES Y ESTRUCTURALES EN EL APARATO  
GENITAL DE LA OVEJA, SOMETIDA AL CONTROL  
DE LOS CICLOS SEXUALES CON EL SISTEMA P. G.

Departamento de Fisiología  
Facultad de Veterinaria  
Universidad Complutense de Madrid  
1982



BIBLIOTECA

**Colección Tesis Doctorales. N<sup>o</sup> 142/82**

**© Joséfina María Illera del Portal**  
**Edita e imprime la Editorial de la Universidad**  
**Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía**  
**Noviciado, 3 Madrid-8**  
**Madrid, 1982**  
**Xerox 9200 XB 480**  
**Depósito Legal: M-20177-1982**

Josefina M<sup>a</sup> Illera del Portal

*"MODIFICACIONES FUNCIONALES Y ESTRUCTURALES EN EL APARATO  
GENITAL DE LA OVEJA SOMETIDA AL CONTROL DE LOS CICLOS  
SEXUALES CON EL SISTEMA PG".*

ESTA TESIS DOCTORAL HA SIDO  
DIRIGIDA POR EL PROF. DR. D.  
TOMAS PEREZ GARCIA.

Departamento de Fisiologia  
Facultad de Veterinaria  
Universidad Complutense de Madrid  
Septiembre 1981

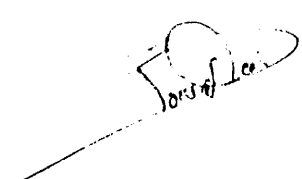


"MODIFICACIONES FUNCIONALES Y --  
ESTRUCTURALES EN EL APARATO GENI  
TAL DE LA OVEJA SOMETIDA AL -  
CONTROL DE LOS CICLOS SEXUALES  
CON EL SISTEMA PG".

MEMORIA que para la colación del  
grado de Doctor, presenta  
la Licenciada en Veterina  
ria Dña. Josefina María -  
Illera del Portal.

ESTA TESIS DOCTORAL HA SIDO REALIZADA  
BAJO LA DIRECCION DE:

Prof. Dr. D. Tomás Pérez García



Licenciada Dña. Josefina  
María Illera del Portal,  
aspirante al grado de -  
Doctor en Veterinaria.

Madrid, Septiembre, 1981

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA  
FACULTAD DE VETERINARIA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

---

*"MODIFICACIONES FUNCIONALES Y ESTRUCTURALES EN EL APARATO  
GENITAL DE LA OVEJA SOMETIDA AL CONTROL DE LOS CICLOS  
SEXUALES CON EL SISTEMA PG".*

Madrid, Septiembre, 1981

Este trabajo se ha realizado con una beca del Ministerio " de Educación, Universidades e Investigación convocada para el desarrollo del Plan de Formación de Personal Investigador.



*A mi padre*



*La realización de esta memoria ha sido posible gracias al trabajo, apoyo, dedicación y consejo de una persona muy entrañable para mí.*

*Durante el tiempo que se ha empleado en la realización de este trabajo, ha habido de todo: momentos alegres y esperanzadores, momentos tristes y difíciles, éstos últimos son los que - han dejado en mí más huella, pues en esos momentos siempre encontraba alguien que, con su optimismo e interés en que las cosas - quedaran siempre mejor, su tesón, consejo y aliento, me han ayudado no solo en el terreno profesional sino que también han contribuido a ir completando mi formación en la vida; a los que me dieron las directrices y orientaciones que encaminaron y fueron construyendo poco a poco este trabajo; a todas aquellas personas que al leer estas líneas se sientan identificadas, a todos os dedico mi más profundo y sincero agradecimiento.*

## I N D I C E

	Página
1.- JUSTIFICACION .....	1
2.- INTRODUCCION .....	6
2.1.- Aparato genital de la oveja .....	7
2.2.- Ciclo reproductor de la oveja .....	14
3.- CAMBIOS MORFOLOGICO-FUNCIONALES QUE ACONTECEN EN EL APARATO REPRODUCTOR DE LA OVEJA DURANTE EL CICLO ES TRAL (REVISION BIBLIOGRAFICA) .....	18
3.1.- Control neuroendocrino del ciclo estral ...	45
3.1.1.- LHRH: Localización y elementos de control .....	48
3.1.2.- Secreción preovulatoria de LHRH .	53
3.1.3.- Respuesta hipofisaria a la LHRH .	55
3.1.4.- Interrelación entre LH y otras hormonas .....	56
3.2.- Estado de anoestro .....	62
3.3.- Esteroidogénesis .....	73
3.4.- Oogénesis .....	99
3.5.- Ovulación .....	111
3.5.1.- Factores comportamentales que afectan a la ovulación .....	130
3.6.- Cuerpo luteo .....	133
3.6.1.- Regresión del cuerpo luteo .....	138
3.7.- Sincronización del celo .....	155

4.- MATERIAL Y METODOS .....	162
4.1.- Animales de experimentación .....	163
4.2.- Protocolo de tratamiento experimental .....	167
4.3.- Obtención de muestras .....	171
4.3.1.- Citología vaginal .....	171
4.3.2.- Perfusión ovdrica .....	171
4.3.3.- Otros órganos del aparato genital. ....	173
4.3.3.1.- Trompas .....	173
4.3.3.2.- Utero .....	173
4.3.4.- Muestras de sangre para Radioinmu- noanálisis .....	174
4.4.- Técnicas histológicas .....	175
4.4.1.- Preparación de muestras para microscopía óptica .....	175
4.4.2.- Preparación de muestras para microscopía electrónica .....	175
4.5.- Radioinmunoanálisis .....	177
5.- RESULTADOS .....	182
5.1.- Estado general de los animales .....	183
5.2.- Estudio macroscópico .....	184
5.2.1.- Ovarios .....	184
5.2.2.- Trompas .....	206
5.2.3.- Utero .....	206
5.3.- Estudio microscópico .....	207
5.3.1.- Ovarios .....	207
5.3.2.- Trompas .....	208
5.3.3.- Utero .....	208



5.3.3.1.- <i>Cuerpo del útero</i> .....	208
5.3.3.2.- <i>Cuello del útero</i> .....	209
5.4.- Concentraciones hormonales por RIA .....	214
6.- DISCUSION .....	226
7.- CONCLUSIONES .....	285
8.- RESUMEN .....	289
9.- BIBLIOGRAFIA .....	292

## 1.- JUSTIFICACION

Fueron DUTT y CASIDA (1948) los que por primera vez demostraron la acción frenadora de la progesterona sobre la actividad ovárica de la oveja al administrarla seriamente por vía parenteral.

Sin embargo, este método que sin duda marcó un extraordinario avance en el control de la ovulación ovina, era un tanto complicado por cuanto suponía la administración de diecisiete dosis. Se hizo pues necesario el estudio de nuevas técnicas que permitieran una aplicación más práctica de este sistema, que si bien en el terreno experimental proporcionaba resultados positivos, no era factible su generalización en el terreno práctico-ganadero.

En 1968, ROBINSON por un lado y PEREZ GARCIA por otro, estudian nuevos métodos aplicativos con resultados favorables y consecuencia de ello ha sido el control de los ciclos sexuales en los ovinos, de una manera práctica y sencilla. Nos estamos refiriendo más concretamente al método de las esponjas vaginales, también llamado australiano y al sistema Progesterona-Gonadotropina (PG), con los cuales se ha sincronizado el celo a millones de ovejas con resultados altamente satisfactorios. A estos sistemas se ha sumado otro más moderno: consiste en la aplicación de progesterona o progestágenos mediante implantes subcutáneos (sistemas americano y francés) que está alcanzando una amplia difusión al simplificar aún más, los métodos anteriores.

En todos estos sistemas y para asegurar la maduración folicular se hace preciso utilizar, después del tratamiento progestérgico, una inyección de gonadotropina sérica, en dosis variables según los fines que se persigan, pues la administración de grandes dosis se ve acompañada de partos múltiples de 4 y 5 corderos via--

bles, aunque mediante perfusión uterina PEREZ GARCIA (1968b) ha -- conseguido obtener unas superovulaciones de hasta 15 óvulos.

Entre las modificaciones morfológico-funcionales del ovario tras la utilización del método superovulatorio, nos encontramos, como es lógico, con los pertinentes cuerpos lúteos activos que liberan la hormona maternal correspondiente para asegurar la ulterior gestación.

A pesar de la gran difusión que ha tenido en España el control de los ciclos sexuales en ovejas con el sistema PG, no se ha realizado un estudio completo y profundo sobre las modificaciones que pueda experimentar el aparato genital femenino, que de alguna forma pudieran explicar el por qué de los porcentajes de fertilidad relativamente bajos (60%) que se obtienen en los primeros estros provocados en contraposición con la elevada fertilidad (90%) de los estros subsiguientes. A este respecto se han emitido numerosas hipótesis de trabajo como pueden ser las modificaciones uterinas y cervicales así como la presencia de determinadas secreciones que impiden el normal progreso de los espermatozoides, con lo cual se disminuirían las cifras normales de fertilidad; sin embargo, estas hipótesis, hasta el momento, no han podido ser confirmadas por un estudio morfológico preciso.

Entre los factores que pudieran influir en esa sub-fertilidad ya apuntada destacan también los de comportamiento, estudiados entre otros por JENNINGS y col. (1972).

La administración de sustancias progestágenas en las hembras

bras domésticas tratando de regular el ciclo sexual ha sido motivo de muchas opiniones, no olvidemos que en definitiva esa regulación puede ir acompañada, como hemos dicho, de un aumento en la producción con el consiguiente componente económico, de ahí que hayan -- sido muy variadas las opiniones y también numerosos los trabajos -- que a tal fin se han publicado.

La administración de las aludidas sustancias producen una serie de cambios (pH vaginal, disminución del grosor del epitelio superficial y capa glandular del útero, etc.) que cita STAN, muy recientemente (1980).

Sin embargo, no se ha encontrado en la amplia bibliografía consultada ningún trabajo que relacione esos cambios con las -- distintas dosis de hormonas.

Con el objeto de poder conocer las modificaciones morfológico-funcionales que experimenta el aparato genital de la oveja sometida al tratamiento de progesterona-gonadotropina, como sistema -- de control de los ciclos sexuales, se ha diseñado este trabajo que pretende deducir la posible correlación entre dosis administrada y modificaciones estructurales y funcionales de las distintas partes que integran el aparato genital de la oveja.

En la primera parte de este trabajo y bajo el epígrafe -- de introducción se ha incluido la anatomía y fisiología del aparato genital de la oveja aún cuando se haya realizado de una manera somera, por cuanto los hallazgos más recientes se incluyen en la -- revisión bibliográfica que se hace en la tercera parte del trabajo

bajo el epígrafe de cambios morfológico-funcionales que acontecen en el aparato reproductor de la oveja durante el ciclo estral.

En esta revisión bibliográfica se ha puesto especial -- atención en recoger los trabajos de mayor interés o relieve rela-- cionados con los hechos que constituyen nuestra propia experimen-- tación. Por otro lado se ha realizado una minuciosa búsqueda bi-- bliográfica si bien se ha tenido en cuenta el incluir solo traba-- jos posteriores al año 1970 por cuanto que, como a partir de -- esta fecha las técnicas de estudio, especialmente en lo que a de-- terminación de hormonas se refiere, han sufrido un cambio tan radi-- cal, consideramos que los trabajos anteriores, si bien muy respe-- tables, podrían inducir a errores por utilizarse en ellos técni-- cas completamente distintas y no tan precisas como las actuales. Unicamente cuando la trascendencia del trabajo lo requería, pues en realidad existen en este campo trabajos considerados como clá-- sicos, que lógicamente había que citar, se ha hecho la oportuna -- excepción y se han incluido en nuestra bibliografía.

6.

## 2.- INTRODUCCION

## 2.1.- APARATO GENITAL DE LA OVEJA

El aparato genital de la oveja ocupa una posición anatómica entre la vejiga y el recto y se pueden considerar como órganos genitales los ovarios, las trompas uterinas o de Falopio, el útero, la vagina (con su vestíbulo), y la vulva.

### Ovarios

Los ovarios son estructuras en forma de almendra de 1,5 á 2 cm de largo situados en el borde del mesovarium y asentados -- cerca del margen lateral de la entrada pélvica en relación a la - arteria iliaca externa. Cuando la oveja está preñada, la posición de los ovarios se hace más craneal.

Cada ovario tiene una superficie irregular que se acentúa más con el desarrollo de los folículos y tienen un color cremoso pálido con áreas más transparentes a medida que se desarrollan los folículos.

La arteria y venas ováricas y el nervio espermático interno penetran en el órgano por el borde craneo-dorsal.

### Trompas uterinas ó de Falopio

Se trata de estructuras flexuosas, especialmente en su extremo infundibular. El margen del infundibulum está hendido en protuberancias irregulares que reciben el nombre de fimbrias. Estas se encuentran unidas a una bolsa (bolsa ovárica) formada por el pliegue sobre el borde libre del ligamento ancho y a través de esta bolsa pasa la trompa de Falopio. En el extremo caudal, las -



uniones con los cuernos uterinos no están marcadas debido a la -- forma de punta de los cuernos en sus extremos craneales. El diámetro máximo de cada trompa es de aproximadamente 2 cm en el animal no grávido.

#### Utero

En el útero se distinguen varias partes: dos cuernos, - un cuerpo y el cervix.

Los cuernos uterinos en el animal no grávido tienen hasta 12 cm de longitud y terminan en punta uniéndose a las trompas. Forman una espiral cerrada que se une al cuerpo uterino caudalmente. En la región del cuerpo, y en una extensión de unos 2,5 cm ó más los cuernos tienen una cubierta peritoneal común, lo que le da apariencia de un cuerpo mayor. El cuerpo uterino de la oveja es menor de 5 cm de largo y contiene el cervix en su extremo caudal.

Durante la gestación, él o los cuernos uterinos se alargan en todas direcciones extendiéndose craneal y ventralmente entre las vísceras abdominales y la pared ventral del abdomen hasta el propio cartílago xifoides del esternón. Cuando la gestación es unilateral el eje del cuerpo se desvía hacia la derecha del plano medio debido a la presión del rumen.

Por su interés indiquemos algo referente al Ligamenta lata uteri

Se trata de los pliegues bilaterales del peritoneo abdominal y pélvico. Cranealmente, cada uno se origina en la parte --

opuesta en la mitad de la última costilla mientras que caudalmente terminan a nivel del acetábulo. Los extremos caudales están -- unidos para formar un pliegue genital transverso que parcialmente divide la cavidad peritoneal pélvica en una bolsa superior recto-genital y una inferior vesico-genital.

En el extremo libre de cada ligamento asienta el ovario, la trompa uterina y el útero. El pliegue genital contiene el cervix y el extremo craneal de la vagina.

Los ligamentos tienen una forma trapezoidal y están compuestos de dos capas de peritoneo incluídas en tejido conectivo, a través del cual pasan los vasos sanguíneos y linfáticos así como los nervios de los órganos genitales.

Los ligamentos están arbitrariamente divididos dentro - del mesovario, relacionados con el ovario, el mesosalpinx con la trompa uterina y el mesometrium con las partes restantes de la -- porción peritoneal del aparato genital.

Desde el lado lateral de cada ligamento, pasa una extensión similar a un dedo de guante hasta el anillo inguinal interno, se trata de ligamento redondo del útero - ligamentum teres uteri. Generalmente se confunde y mezcla con el peritoneo de esta región y, en algunos casos, puede entrar en el canal inguinal.

Los ligamentos portan las arterias y venas útero-ovárica, uterina media y ramas de la uterina caudal. Las arterias y venas se anastomosan con vasos similares formando una especie de arco cerca de la inserción del tracto genital.

Continuando con el útero de la oveja digamos que la longitud del cuerpo de este órgano es menor de 5 cm en el animal no grávido, aunque superficialmente aparenta ser más grande debido a las conexiones conjuntivas con la parte caudal de los cuernos uterinos. La línea de demarcación entre el útero y la vagina no es visible desde el exterior, si bien, internamente el cervix se proyecta 1 a 1,5 cm dentro de la cavidad vaginal. El fornix vaginae es muy deficiente ventralmente pero en sentido dorsal se extiende hasta una profundidad de casi 2 cm por encima del cervix.

Existen variaciones considerables en la proyección del cervix dentro de la vagina, incluyéndose desde una falta de proyección hasta un completo fornix vaginal según razas de los animales.

El canal cervical está prácticamente ocluido por una serie de prominencias regulares y depresiones formando un recubrimiento interno de la estructura que tiene casi 4 cm de longitud.

La mucosa interna del útero se caracteriza por la presencia de un número de pequeñas prominencias - las carúnculas - que presentan apariencia circular, con uno o dos milímetros de altas, en la oveja no grávida y que se extienden desde el extremo craneal hasta el caudal.

Se encuentran estas carúnculas dispuestas en cuatro filas a lo largo del cuerno, cada fila contiene entre ocho y catorce carúnculas. En la parte craneal del cuerpo uterino se encuentran unas cuantas carúnculas más pequeñas

La mucosa que recubre el cuerpo del útero está dispuesta en bandas circulares de elevaciones longitudinales separadas por una región estrecha sin bandas. Al alcanzar estas bandas el cervix se hacen más prominentes y forman una serie de 5 ó 6 filas a lo largo del canal cervical, reduciendo la luz considerablemente. El canal en cada banda se encuentra prácticamente ocluido y, entre las bandas tiene alrededor de 1 cm o más de diámetro. Las bandas están separadas unos 0,5 cm estando la última banda proyectándose dentro de la vagina.

#### Vagina

La vagina parcialmente tiene estructura peritoneal y parcialmente retroperitoneal. La primera de ellas se extiende entre 2 a 2,5 cm de la unión con el útero antes de que se refleje dorsalmente dentro del recto formándose así la parte caudal de la bolsa recto-genital. Ventralmente, la cubierta peritoneal es menos extensa y se refleja dentro de la uretra para formar la bolsa vesico-genital.

La vagina tiene una longitud de 7 a 10 cm y 2,5 cm de diámetro y conecta el útero con la vulva. El orificio uretral externo está situado en la pared ventral a aproximadamente 3 cm de la comisura central de la vulva.

Para su mejor descripción la vagina se divide en dos porciones: la vaginal y el vestíbulo, la línea de división es la abertura uretral externa.

Ocasionalmente se encuentra un pliegue de membrana mucosa

sa -el himen- especialmente en corderas, que cruza el suelo de la vagina, inmediatamente craneal a la abertura uretral externa.

En el extremo craneal el cervix normalmente se proyecta dentro de la cavidad con una extensión variable, según las razas, como se ha indicado anteriormente.

El vestíbulo contiene un número de aberturas en sus paredes ventral y lateral. En la línea medio ventral junto con la - abertura uretral se encuentra el divertículo suburetral; se trata de un corto y pequeño saco ciego que se extiende ventralmente en la pared vestibular con la abertura uretral en el lado craneal del extremo abierto.

Las glándulas vestibulares mayores (Glandulae vestibularis) no están presentes en todas las ocasiones y si están presentes, son pequeñas y situadas en la pared lateral.

#### Vulva

Este órgano comprende la abertura externa del sistema - urogenital, el clítoris y estructuras anejas. La abertura externa o vulva partida, está rodeada por los labios pudendos que forman una gruesa proyección en la comisura ventral. Inmediatamente craneal a esta comisura se encuentra una depresión, la fosa del clítoris, cubierta en el extremo craneal por un pliegue de mucosa. - La fosa está ocupada por un clítoris, corto, cuya parte visible - solo es la parte terminal. El órgano tiene unos 2,5 cm de longitud y 0,5 de diámetro y comprende dos cruras, un cuerpo y una -- glándula.

Las cruras están unidas al arco isquial y una porción - del cuerpo y toda la glándula asienta libremente en la fosa. El - pliegue de membrana mucosa de la fosa sobrecubre el clítoris formando el prepucio del clítoris (praeputium clitoridis).

Internamente, las glándulas están compuestas de tejido erectil mientras que el cuerpo es fundamentalmente fibroso. En la región de las cruras existen unas cuantas fibras musculares que - representan el músculo isquiocavernoso.

Por debajo de la mucosa de la vulva se encuentra el músculo constrictor (M. constrictor vulvae). Dorsalmente está unido al músculo del esfínter externo del ano mientras que ventralmente se ciñe al clítoris. Las fibras forman la base de los labios y actúan como un verdadero esfínter.

El músculo constrictor de la vulva se continua cranealmente con el músculo constrictor del vestíbulo (M. constrictor -- vestibuli). Este último músculo no afecta por completo al vestíbulo ya que en la región dorsal está ausente. Dorso-lateralmente está unido al ligamento suspensor del ano y actúa como un esfínter del vestíbulo.

## 2.2.- CICLO REPRODUCTOR DE LA OVEJA

Los principales acontecimientos que se presentan durante el ciclo estral de la oveja se pueden dividir en los relacionados con el crecimiento del folículo y los relativos al desarrollo del cuerpo amarillo. Los primeros se subdividen en dos periodos - proestro y estro. La fase del desarrollo del cuerpo amarillo puede subdividirse también en otros dos periodos que son el metaestro y diestro. Se completan así los cuatro periodos del ciclo estral que se encuentran en todas las hembras domésticas.

### Proestro

El proestro de la oveja se caracteriza por el crecimiento del folículo por la acción de la hormona estimulante del folículo (FSH), a la vez encontramos una tasa elevada de los estrógenos circulantes, producidos por el propio ovario, que son los responsables del aporte sanguíneo al aparato genital tubular y que ocasionan el edema que se presenta desde la vulva hasta el oviducto. La vulva aparece hinchada, el vestíbulo se torna hiperémico y las glándulas del cuello producen una secreción serosa parecida a un flujo vaginal.

Este periodo dura en la oveja aproximadamente dos días.

### Estro

Las manifestaciones psíquicas de celo que aparecen en esta especie se deben a la acción del estradiol sobre el sistema nervioso central, si bien en la oveja esas manifestaciones son me

nos acusadas que en otras hembras (vaca, yegua). En efecto, la oveja en estro puede buscar al morueco, pero su deseo sexual se manifiesta por su tolerancia para que el macho la excite y la cubra. Por esta razón, es difícil descubrir el estro en la oveja y para -- lograrlo suele utilizarse el macho vasectomizado o provisto de -- mandil, se trata en definitiva del clásico recela. En otras oca-- siones se suele marcar, el chaleco o mandil que lleva el morueco con una pintura especial para que deje una señal en la oveja que es montada.

La duración de la receptividad en la oveja es variable, suelen darse como cifras normales las 30-40 horas (variaciones -- entre 3 y 50 horas). El estro es más corto en las corderas que en las ovejas adultas. Es interesante indicar que al principio y final de la estación reproductora el celo suele ser más corto en la mayoría de las razas de ovejas.

La primera ovulación de cada estación reproductora o la del comienzo de la pubertad no se acompaña, con frecuencia, de estro psíquico, ya que parece necesaria una pequeña cantidad de progesterona para desencadenarlo y como es lógico en los animales citados no existe por no haber sucedido un ciclo anterior.

La ovulación suele aparecer durante la última mitad del celo, ya que se halla más relacionada con el final que con el -- principio del estro. Cuando en algún animal se produce más de una ovulación éstas suelen estar separadas por un intervalo de unas -- dos horas. El ovario derecho ovula más frecuentemente que el iz-- quierdo, las proporciones son del 60 y 40% respectivamente.



El comienzo del celo suele ser de aparición brusca, siendo más gradual su terminación y como quiera que su duración es, - como hemos señalado, de dos días, se observa casi siempre cierta receptividad sexual durante las horas de luz diurna.

La olfacción representa un papel importante en la identificación de la oveja en estado de estro por parte del carnero. Esta atracción (feromonas sexuales) comienza a aparecer en el estadio anterior, esto es antes de que la oveja se encuentre propicia para la copulación.

Por lo que se refiere a las concentraciones hormonales durante este periodo diremos que lo referente a la FSH y estrógenos hay pocas variaciones respecto al proestro; sin embargo, en lo que se refiere a la hormona luteinizante (LH), horas antes de la ovulación es cuando encontramos mayor concentración de esta -- hormona. Se trata de la oleada de LH preovulatoria.

Por lo que se refiere a la aparición del celo después del puerperio, se puede decir en general que en la oveja no comienza la actividad ovárica hasta después del destete y en aquellas razas que se reproducen estacionalmente se retrasa el primer estro hasta el próximo otoño.

#### Metaestro

En la oveja el metaestro tiene una duración de dos días. Durante este periodo comienza a iniciar su función el cuerpo amarillo o cuerpo luteo caracterizándose esta acción por la aparición de cantidades detectables de progesterona en la sangre periférica.

### Diestro

Se llama diestro al periodo de cuerpo amarillo, que en los óvidos se hace funcional tanto si se produce gestación como si la oveja no queda grávida. Durante este periodo se sintetizan grandes cantidades de progesterona que lógicamente repercuten en el desarrollo de las glándulas mamarias y en las modificaciones endometriales. El miometro se desarrolla por influjo de la progesterona, mientras que las glándulas uterinas secretan un material viscoso y espeso (leche uterina) que sirve como medio de nutrición para el cigoto. El desarrollo glandular continua en todo el aparato genital. Si llega un cigoto al útero, el cuerpo amarillo perdura durante toda la gestación pero si el huevo no es fecundado, dicho cuerpo amarillo permanece funcional tan solo hasta el duodécimo o decimotercer día. Más adelante explicaremos con todo detalle las causas de esta ausencia de funcionalidad del cuerpo lúteo.

La disminución de concentración de progesterona propicia la liberación de hormona folículo estimulante, crecimiento de un nuevo folículo e iniciación de un nuevo ciclo estral en caso de estar en la estación reproductora, ya que en caso contrario el animal estará en anoestro hasta la nueva estación.

3.- CAMBIOS MORFOLOGICO-FUNCIONALES  
QUE ACONTECEN EN EL APARATO RE-  
PRODUCTOR DE LA OVEJA DURANTE -  
EL CICLO ESTRAL.  
REVISION BIBLIOGRAFICA

El ovario, como ha quedado señalado, es un cuerpo esférico unido a la pared del abdomen por una lámina de tejido conectivo (mesovarium) cerca de la parte superior de la trompa de Falopio. Está formado por una gran cantidad de tejido conjuntivo laxo, rico en colágeno en el que se encuentran cavidades esféricas (folículos) que contienen los oocitos, rodeados por numerosas células de tipo epitelial (células foliculares).

El principal proceso fisiológico que afecta al tejido conectivo del ovario es la ovulación, momento en que los oocitos quedan liberados para poder penetrar luego en el aparato tubular. Este proceso lleva aparejado la formación de una especie de senda a través del tejido conectivo. El propio folículo y sus contenidos forman una región especializada de tejido conectivo.

Después de la ovulación las células foliculares crecen y cambian de carácter para formar una estructura glandular, el cuerpo luteo, que posee un armazón de tejido conectivo y posteriormente se reabsorbe.

El óvulo de los mamíferos es la única célula que posee a su alrededor una gruesa envoltura, la zona pelúcida, que es metacromática tiñéndose fácilmente por el método del PAS; gracias a esta propiedad se ha podido saber que contiene ácido hialurónico y polisacáridos sulfatados y neutros. La membrana vitelina del huevo de las aves recuerda a esta zona pelúcida en cuanto a su posición sobre la superficie de la célula.

Las células foliculares, en las que se desarrolla el -

óvulo, son de origen conectivo, soportadas, bien por su propia estructura intrínseca o por un armazón, mal definido, de carácter - no colágeno. La masa esférica de células que contienen el oocito está rodeada de tejido colágeno conectivo (túnica interna), del - que se encuentra separado por una membrana basal que recuerda a - la que se encuentra bajo los epitelios. Antes de la ovulación el folículo crece fundamentalmente por acúmulo de líquido extracelular (líquido folicular) hasta que, inmediatamente antes de la ovulación, forma una especie de saco esférico recubierto de una capa de células foliculares en las que se encuentra embebido el oocito. Durante este crecimiento se expande hacia la superficie del ovario, hasta que se cubre por una capa, relativamente delgada, de - tejido conectivo. El tamaño del folículo varía con las distintas especies, y por supuesto con el estado del animal (HARKNESS, 1964).

Más adelante, cuando concluyamos el estudio del soporte morfológico del aparato reproductor, nos ocuparemos con detalle - de los cambios que acontecen en las células que rodean el óvulo.

Los problemas que surgen en el crecimiento del folículo y la subsiguiente ovulación solamente pueden comprenderse a la luz de una información bibliográfica cuantitativa que desgraciadamente no existe. Solamente hechos aislados de los cuales daremos --- cuenta en esta revisión.

Se puede asegurar, aunque no se tenga evidencia experimental, al menos para la oveja, que el tejido conectivo que rodea el folículo sufre unas variaciones muy similares a las apuntadas para el folículo; sin que, por el momento, se tenga una idea cla-

ra de las tensiones existentes en la pared del folículo en relación con la cantidad de colágeno presente.

La oquedad que queda en la pared, después del desprendimiento, es ligeramente oval, siendo lisos sus bordes.

El crecimiento del folículo produce una protusión de la superficie ovárica, a modo de una burbuja esférica, con una región circular carente de sangre en su centro, y con un diámetro de -- aproximadamente la cuarta parte de su totalidad, que aparentemente se forma por compresión de los vasos sanguíneos al crecer el folículo.

El líquido folicular contiene alrededor del 7% de materia seca, siendo en su mayoría proteínas, en líneas generales recuerda en su composición al plasma sanguíneo, siendo los principales iones el  $\text{Na}^+$  y el  $\text{Cl}^-$ . Se trata de un líquido viscoso, metacromático que contiene material que se tiñe por el método de PAS.

Se ha sugerido que el contenido folicular en la ovulación absorbe líquido del exterior y esta es la causa de su hinchazón. También que existe un aumento de la concentración de solutos y de la presión osmótica en el momento de la ovulación; sin embargo, estas modificaciones no explican por completo el proceso sino que deben existir otros factores más influyentes.

Se ha indicado, aunque no está demasiado bien confirmado, que la pared folicular se rompe por la acción de enzimas proteolíticas que producirían un debilitamiento del tejido conectivo de sostén, creyéndose que los defectos de este armazón conectivo -

puede que sean los responsables, al menos en parte, de fallos en la ovulación e incluso de la formación de quistes ováricos.

Cada cuerno uterino está unido a la pared del abdomen - por una lámina de tejido conectivo (mesometrium) a través de la - cual pasan los vasos sanguíneos y los nervios. La pared del útero tiene dos capas principales: una muscular externa (miometrium) y una capa de tejido conectivo, interna, provista de células epiteliales (endometrium). En el cuerno uterino la capa muscular es doble existiendo una subcapa más externa donde las fibras muscula--res van en sentido longitudinal separadas de una capa delgada de tejido conectivo, y otra subcapa más interna en la que las fibras adoptan una estructura circular.

El miometrio es más voluminoso que el endometrio, una - gran parte de éste está compuesta de tejido conectivo o "estroma" en contraposición al epitelio. También el miometrio contiene bastante cantidad de tejido conectivo.

Sin duda, dada su funcionalidad, el endometrio es la -- parte de la pared uterina que ha recibido mayor atención para conocer su estructura, y, por supuesto, dentro del endometrio, la - parte mejor estudiada es el epitelio; esta parte asienta sobre -- la membrana basal, estando por debajo un tejido rico en colágeno que se continua con el tejido conectivo de las capas más profundas de la pared.

En el estroma no aparece una distinción neta entre colágeno y reticulina, al menos ultraestructuralmente. Sin embargo sí

se han descrito cambios del estroma endometrial durante las distintas fases del ciclo sexual de algunas hembras, aunque no de la oveja.

Por lo que respecta a la composición del colágeno uterino, los datos que figuran en la literatura, un poco antigua, se refieren a un cálculo aproximado determinando el contenido en hidroxiprolina de la muestra, considerando que ésta representa el 13,4% del colágeno. Se han determinado también variaciones del contenido en los distintos estadios del ciclo sexual, pero al no tener datos concretos sobre la hembra que a nosotros nos ocupa omitimos esas cifras.

Sin duda, el colágeno forma cuantitativamente una gran proporción del contenido total de proteína uterina.

Por lo que se refiere al reemplazamiento o restitución del colágeno en el útero, utilizando técnicas con lisina- $C^{14}$ , se ha podido demostrar que el útero reemplaza mucha mayor cantidad de colágeno que la piel, los tendones o la aorta, hecho éste que le confiere al útero unas características de extensibilidad mayores que para otros tejidos, incluso dentro del útero, la parte cervical, es más extensible por contener más cantidad de tejido conectivo.

Las alteraciones hormonales de cualquier índole pueden influir en la tasa de tejido conectivo del aparato reproductor de la hembra, así la ovariectomía ocasiona una reducción del contenido de colágeno en los cuernos uterinos; la administración de estrógenos, por el contrario, aumenta ligeramente el contenido de



colágeno si bien este incremento no es lineal con el aumento de peso del órgano. La progesterona no influye en ningún sentido sobre el contenido de tejido conectivo. Después del parto, la distensión del útero lógicamente desaparece, regresando el órgano a su tamaño normal, la pérdida de colágeno en este estadio es similar a la del resto del ciclo, si bien el ritmo de pérdida de colágeno es mayor que el de cualquier otro tejido del mamífero; no obstante, falta por establecer los mecanismos básicos por los que el colágeno desaparece tan rápidamente del útero en el post-parto, aunque se ha sugerido una posible digestión por el propio tejido convirtiéndose en pequeños péptidos, lo que ocurre es que esta su gerencia procede de estudios "in vitro" y las extrapolaciones al estado natural son siempre dudosas.

Por lo que se refiere a la elastina en el útero, se encuentra en su mayor parte en las paredes de los vasos sanguíneos y el estado de gravidez eleva el contenido de elastina casi en la misma proporción que lo que acontece con el colágeno.

El tejido conectivo uterino no parece mostrar peculiaridades especiales. El epitelio del endometrio, al igual que otros epitelios, descansa sobre una capa fácilmente teñible por PAS. La microscopía electrónica presenta una línea densa de anchura constante que va paralela a la membrana celular de la superficie inferior del epitelio, separada de ella por un espacio de casi su mismo grosor. Esa estructura (línea y espacio) tiene un grosor variable en las distintas hembras y varía también con el estadio del ciclo sexual. GADEV (1971) afirma que las células pigmentarias --

del útero tienen origen conjuntivo. Se admite asimismo que las células pigmentarias ramificadas alrededor de los vasos uterinos no son más que células adventicias (pericitos) mientras que las células pigmentarias redondas y no ramificadas son macrófagos (histiocitos). El pigmento de las mismas se halla formado a base de pseudomelanina.

Los tejidos conectivos más profundos presentan las reacciones de tinción usuales, variables con las diferentes condiciones fisiológicas, sobre todo en lo que se refiere a la intensidad de coloración, siendo ésta mayor durante la fase proliferativa -- que en los otros estadios.

El cervix es un anillo de tejido especializado situado en el extremo inferior del útero, en el animal no grávido se trata de un estrecho canal rígido que desemboca en el extremo superior de la vagina, que es mucho más ancha que aquel. Tanto el cervix como la vagina constituyen el llamado canal del nacimiento, -- lugar por donde el feto abandona el claustro materno a la hora -- del parto, y presentan una estructura que difiere significativa-- mente en dos aspectos del útero: primero en cuanto a su composi-- ción que es fundamentalmente colágena, aunque incluya alguna musculatura lisa y, segundo, la naturaleza del epitelio limitante. - En cierto sentido se pueden considerar ambas estructuras como una extensión interna de la piel a la que se asemejan mucho más que - el útero.

A juzgar por su aspecto histológico, el cervix contiene poco tejido elástico, éste se encuentra principalmente asociado -

al músculo aunque existe una capa delgada bajo el epitelio, en el extremo vaginal donde el epitelio es del mismo tipo que el que re cubre la vagina.

La concentración de colágeno en el cervix de la oveja -- no grávida es aproximadamente el doble que la existente en el -- cuerpo del útero, cantidades que varían según el estado fisiológico del animal, en el sentido de aumentar durante la preñez, pero sin apreciables diferencias en los distintos estadios del ciclo -- estral. El colágeno cervical disminuye con la ovariectomía y el -- tratamiento combinado de distintas hormonas demuestra que única-- mente los estrógenos son los que aumentan significativamente el -- contenido de colágeno total en el cervix.

Es indiscutible que los cambios que acontecen en el cer vix, incluso en la vagina, durante la gestación predisponen a estas estructuras para que se vayan acomodando para facilitar, en -- el momento del parto, la salida del feto.

Han sido muchos los intentos que se han realizado tra-- tando de estudiar las propiedades mecánicas y sus cambios durante la gestación, de esas estructuras, pero hasta el momento los méto-- dos descritos, si exceptuamos los electrofisiológicos a los que -- nos referiremos más adelante, dejan un tanto que desear por cuanto no explican gran parte de los hechos que posteriormente producen. A modo de resumen se podría decir que es posible distinguir dos propiedades del cervix, propiedades que dependen del armazón de colágeno: la primera es la naturaleza circular de ese armazón, la segunda es su extensibilidad. Pero estas dos propiedades pare-

cen variar muy poco a lo largo de la gravidez, los cambios se -- producen en el momento del parto y dependen directamente de las alteraciones de la sínfisis pubiana, que a su vez son dependientes de todo el complejo hormonal que se "dispara" en el momento del parto, habiéndose demostrado recientemente que además de la oxitocina, a la que se tenía casi por única hormona del parto, -- son otras las que también intervienen (ELLENDORFF, 1979).

En cuanto a los mucopolisacáridos y sustancias similares del cervix, aparte de los pocos conocimientos que se tienen se pueden aplicar los mismos criterios que se han discutido al -- hablar del útero. El epitelio descansa sobre una membrana basal, con apariencia ultraestructural muy semejante a la del útero, ex cepto en el extremo más inferior del cervix, donde es de tipo es camoso, con varias capas de células semejantes a las de la vagina en vez de una simple capa de células. Las células se encuen-- tran conectadas por pequeñas regiones gruesas de sus membranas, son los llamados desmosomas. El estroma contiene material meta-- cromático que puede o no alterarse por el tratamiento hormonal.

La pared vaginal, por su parte, es altamente colágena, contiene casi la misma cantidad que el cervix en la hembra no -- grávida y cambia muy poco a lo largo de la gestación aunque eso sí las variaciones de las propiedades mecánicas, durante este es tadío, son notables.

Concluido el estudio del tejido de soporte o sostén -- veamos, como dijimos, con detalle los cambios que acontecen en -- las células tecales y otras estructuras a lo largo del ciclo re-

productor.

BJERSING y col. (1972), verdaderos maestros en el estudio de los cambios morfológicos del ovario de la oveja a lo largo del ciclo, encuentran que el día 13 del mismo las células y núcleos de la teca interna se presentan generalmente pequeños y elongados, a menudo orientados en paralelo a la membrana basal. Sin embargo, se observan, en varios lugares células de la teca interna mayores que contienen unas cuantas gotitas lipídicas dispuestas en racimos. En el día 15 tanto las células como los núcleos sufren un claro incremento de tamaño y con apariencia epitelioide presentando una disposición casi perpendicular a la membrana basal, habiendo desaparecido la apariencia en racimo sin que la cantidad de lípidos sufra variación. A las 6 horas de la aparición del estro la célula de la teca es más grande y la capa tecal más ancha que en las observaciones apreciadas en otro estado. El incremento de anchura en la capa tecal se debe tanto a la hipertrofia como a la hiperplasia de la misma. A las 6 horas después del estro se pueden ver células tecales degeneradas. A las 15 horas las células de la teca se encuentran contraídas y de forma angular. El citoplasma y los núcleos están fuertemente teñidos y la mayoría de las células contienen una gran cantidad de lípidos.

A las 18-30 horas después del estro se pueden encontrar aún células tecales presentando una apariencia semejante a fibroblastos y orientados paralelamente a la circunferencia del cuerpo luteo incipiente.

El citoplasma contiene aún numerosas gotitas lipídicas incluso después de las 15 horas.

Por lo que se refiere a la membrana granulosa, el día 13 muestra una apariencia compacta con células estrechamente --apuestas que muestran núcleos redondeados con pequeñas cantidades de citoplasma y bordes indistintos; hacia la membrana basal las células muestran una disposición columnar.

Parece que no existen claros cambios morfológicos en la membrana hasta el día 15 unas seis horas después del estro; donde aparecen unos bordes celulares más diferentes, células ligeramente mayores y menos compactas, tanto los núcleos como las células aumentan de tamaño a las 15 horas después del estro. Estos cambios son más pronunciados en los folículos recién rotos.

Los estudios de microscopía electrónica realizados por BJERSING y col. (1972) confirmaron los hallazgos indicados para la microscopía óptica:

En el citoplasma de las células tecales se observa un moderado número de mitocondrias con crestas laminares desde el día 13 hasta seis horas después de la aparición del estro. Se ven también algunas crestas tubulares particularmente en el día 15 y seis horas después de producirse el estro; las mitocondrias aparecen más fuertemente unidas a las 15 horas del estro que en estadíos anteriores. Probablemente como resultado del apelotonamiento "to celular por acumulación de gotas lipídicas.

En las células de la teca se observan tanto retículo -

endoplásmico rugoso como liso. El rugoso es prominente en los días 13-15. El retículo endoplásmico liso aumenta cuantitativamente en las células en el día 15, encontrándose una gran cantidad de ellas a las 6 horas después del estro.

Por lo que se refiere a las células de la granulosa en los días 13 y 15 se encuentran gotas lipídicas que aumentan en las preparaciones correspondientes a las 6 horas después del estro y particularmente localizadas en la membrana basal.

En todos los estadios se observan un número moderado de mitocondrias ovales o elongadas en las células de la granulosa que contienen también crestas laminares o crestas tubulares. Las mitocondrias están distribuidas a través de toda la célula aunque en algunas, y particularmente después de la ovulación, se pueden encontrar en racimo. En este estadio el tamaño y forma de la mitocondria es más variado.

Desde el punto de vista morfológico el oviducto de la oveja se puede dividir en tres partes: infundibulum o preampolla, la ampolla propiamente dicha y el istmo. La unión útero-tubal o área de transición entre el útero y el oviducto puede ser considerada como una cuarta parte. La preampolla que tiene forma de embudo se localiza al final del oviducto; la ampolla, la parte que posee mayor diámetro, forma los dos tercios rostrales de la trompa, termina estrechándose en el istmo que comprende aproximadamente un tercio de la longitud total de la trompa. Por lo general, el examen macroscópico del oviducto revela que la parte istmica tiene un color grisáceo, producido por un pigmento que se -

deposita en la capa muscular.

El examen microscópico de los distintos segmentos del oviducto pone de manifiesto unas notables diferencias. Hablando en términos generales, existe un aumento de grosor de la túnica muscularis y una disminución en el tamaño del lumen así como una mayor complejidad en los pliegues de la mucosa en dirección pre-ampolla-istmo.

El epitelio, según demuestra la microscopia óptica, está formado por células ciliadas y no ciliadas. En la preampolla y en la ampolla las células no ciliadas pueden ser consideradas como secretoras ya que en ciertos momentos del ciclo estral -- existen gránulos abundantes tanto dentro de las células como en el lumen. Otra característica de estas células es que sus partes apicales solapan sobre los bordes apicales de las células ciliadas vecinas, formando protusiones citoplásmicas. El istmo, proporcionalmente, contiene menor número de células no ciliadas, -- que parecen no ser secretoras, ya que carecen de las características de las células no ciliadas que se observan en otras partes del oviducto.

La función de las trompas se puede dividir, como ya es conocido, en dos categorías: transporte de gametos y provisión de un "ambiente" adecuado para la supervivencia de los gametos, fecundidad y los primeros estadios del huevo fertilizado. Además de la trasudación del plasma sanguíneo, las células secretoras del epitelio tubal contribuyen decisivamente en la creación de ese ambiente ideal para el desarrollo del producto de la concep-



ción. La información que se tiene referente al ritmo secretor del oviducto de la oveja procede de los diversos experimentos en los que se han canulado los oviductos quirúrgicamente, con lo que se hace posible recoger el líquido tubal durante períodos de tiempo prolongados. Estos experimentos demuestran que el ritmo de secreción es bajo durante la fase lútea del ciclo elevándose inmediatamente antes de la aparición del estro, alcanzándose el máximo casi al final de esta fase, para luego descender rápidamente a los niveles característicos de la fase lútea del ciclo. Sin duda, hay que correlacionar estos cambios cíclicos con los niveles sanguíneos de los dos esteroides principales del ovario: 17 $\beta$  estradiol y progesterona.

La mayoría de las investigaciones realizadas con el fin de conocer el papel de los estrógenos y la progesterona están basadas en la comparación de animales ovariectomizados y sin tratar con animales que reciben estrógenos exógenos y/o progesterona. El tratamiento con estrógenos después de la ovariectomía aumenta considerablemente la secreción del oviducto. La progesterona administrada sola no aumenta la secreción de fluido por encima del nivel observado en los animales ovariectomizados y no tratados. Un tratamiento con progesterona, previo a la administración de estrógenos, da por resultado un acortamiento de la respuesta estrogénica. Sin embargo, la cuestión que se plantea es conocer si estos experimentos aclaran nuestros conocimientos sobre la influencia de los esteroides ováricos sobre la actividad de las células secretoras en el epitelio tubal, ya que al menos los estrógenos participan en los procesos de trasudación

desde los vasos sanguíneos del aparato genital.

Por el momento no existe demasiada información acerca de la influencia de los esteroides ováricos sobre la apariencia citológica del epitelio tubal y particularmente de las células secretoras. RESTALL (1966) observó los efectos de los estrógenos y progesterona sobre la altura del epitelio. Después de tratar animales ovariectomizados con estrógenos solo, o en combinación con progesterona, la altura del epitelio de la ampolla es comparable a la de animales normales en estro. La progesterona sola evita la altura del epitelio que se presenta en los animales ovariectomizados sin tratamiento.

WILLESENSE (1974) por su parte, estudia en la oveja los cambios morfológicos que acontecen en la ampolla tubae durante el ciclo estral fisiológico, haciendo especial hincapié en el estudio de la altura del epitelio y sus variaciones según la cantidad de secreción tubal. Los hallazgos de este autor se pueden resumir en los siguientes: Durante el proestro, estro y primeros días del metaestro (D-16 al D-3) se encontró un epitelio alto, descendiendo luego gradualmente, obteniéndose los valores más bajos al principio del período de diestro, manteniéndose así hasta el comienzo del siguiente proestro.

Durante el ciclo estral se observó también una aparente ciclicidad en cuanto a la forma y localización de los núcleos de las células secretoras. En el proestro y estro los núcleos mostraron una forma oval y se localizan preferentemente en la base. Durante el metaestro migran a la parte apical de la célula

presentando una forma alargada y delgada. En período de diestro los núcleos se encuentran en las protrusiones citoplásmicas y -- son redondeados. Como quiera que esas protrusiones sobresalen del borde apical de las células ciliadas vecinas, da la impresión de que estos núcleos se extruyen del epitelio.

Con el aumento inmediato de la altura del epitelio, debido a la elevación de los estrógenos el D-16, los núcleos de las células secretoras regresan a la posición basal original. Es -- cuestionable si esta migración se debe considerar como un proceso activo o como pasivo. Existe una relación entre la localización intracelular de los núcleos y la altura epitelial: cuando -- esta última decrece hasta un cierto valor ( $\pm 20 \mu$ ) los núcleos de las células secretoras tienen la posición más apical, esto -- es, protrusiones citoplasmáticas; cuando la altura epitelial sobrepasa esa cifra, predomina la posición basal de los núcleos. -- Como quiera que el epitelio está formado por dos tipos de células, con especializaciones claramente definidas, puede que una -- diferencia en rigidez entre estas células sea la responsable de esos fenómenos. WILLESENSE (1974) sugiere que el proceso de la migración nuclear es un fenómeno pasivo.

En las células secretoras existen cambios evidentes a lo largo del ciclo estral en lo que a cantidad y localización de material PAS positivo se refiere. Durante el proestro y estro -- (D-16 a D-1) solo se encuentra material PAS positivo en unas -- cuantas células secretoras, casi inmediatamente por encima de -- donde se localiza el núcleo; sin embargo, este almacenamiento se

mantiene en su grado máximo durante el metaestro (D-2 a D-7). Durante este período la parte supranuclear completa de la célula, incluyendo la protrusión citoplasmática, está completamente llena de gránulos de secreción. Durante el diestro (D-7 a D-15) el almacenamiento de ese material disminuye siendo mínimo al final de este período. De igual forma a lo largo del ciclo se observan también las variaciones de material PAS positivo, en el lumen, sin que exista correlación entre estas cantidades y las fases del ciclo.

Las variaciones cíclicas en cuanto a localización y cantidad de la secreción celular parecen estar relacionadas con las concentraciones de estrógenos ya que éstos estimulan la síntesis y la progesterona produce su liberación; no obstante, la concentración de progesterona en la oveja no se eleva significativamente hasta D-3 ó D-4, tiempo en el que el óvulo alcanza el útero. De ahí que en la oveja no parece que la progesterona sea la responsable de la liberación.

WILLEENSE y col. (1974) tratando de aclarar esto estudian la actividad secretora del epitelio de la ampolla tubae durante el ciclo estral de la oveja indicando que durante el proestro, inmediatamente después de la elevación del nivel de estrógenos en la sangre, hay una evidente estimulación del aparato biosintético de la célula secretoria: aumento del contorno y cisternas dilatadas del retículo endoplásmico rugoso, llenas de un fino material granular. Se pueden observar membranas rodeadas de gránulos de secreción con distintos tipos de estructuras inter-

nas, pudiéndose distinguir cuatro tipos, probablemente representativos de los diferentes estadios de maduración. Los gránulos, predominantemente presentes durante los tres primeros días del ciclo, se supone que representan la forma inmadura y contienen finas manchas de variable densidad electrónica. Durante la maduración el contenido se hace más denso, pierde su aspecto manchado y se transforma en una estructura cristalina, compuesta de láminas dispuestas paralelamente. Gránulos de este tipo se observan con más frecuencia en la fase lútea del ciclo. En una forma más madura las láminas no están tan paralelas y son menos compactas, observándose estos gránulos en la parte más apical de la célula, donde liberan su contenido cristalino-laminar en el lumen ampular por fusión de la membrana. Esta liberación de productos secretorios se observa fundamentalmente durante las 48 horas que siguen a la aparición del estro. Por ello, casi se puede afirmar que la progesterona poco tiene que ver en este proceso. Se sugiere que los estrógenos estimulan la maduración de los gránulos de secreción, particularmente la maduración de los mismos. Por otra parte, la caída del nivel estrogénico cíclico da por resultado el acúmulo de gránulos con contenido típico cristalino, igual que el observado en la fase lútea del ciclo.

Siguiendo en la línea de sus investigaciones WILLESEN (1974) estudió por microscopía óptica y electrónica el epitelio ampular de ovejas ovariectomizadas después de haber sido tratadas con estrógenos y progesterona con el fin de conocer la influencia decisiva de estos dos esteroides por separado. El epitelio de los animales ovariectomizados, sin tratamiento, recuerdan, en

líneas generales, al encontrado durante la fase de diestro: epitelio bajo, ausencia de material PAS positivo y los núcleos de las células secretoras se localizan en las protrusiones citoplásmicas. El tratamiento con estrógenos hace que el epitelio se encuentre más alto, localización basal de los núcleos y almacenaje máximo de material PAS positivo. La apariencia estructural no difiere mucho de la encontrada en los primeros días del estro siguiente.

Después del tratamiento de progesterona se encuentra una disminución marcada de la cantidad de secreción almacenada, por ello se piensa que la progesterona es la que induce a la liberación. Sin embargo, esto sucede igualmente en los animales control tratados solamente con estrógenos. Consecuentemente, el aspecto típico del epitelio en el diestro puede desarrollarse en ausencia de progesterona y se duda de que este esteroide sea el responsable de la liberación de aquel producto. Existe, eso sí, una diferencia notable en cuanto al tiempo necesario para que el epitelio responda a los estrógenos, entre la oveja normal y la ovariectomizada; en ésta tanto la presencia de gránulos inmaduros de secreción como liberación de secreciones dentro del lumen, no se producen hasta el 42 día del tratamiento estrogénico. La presencia de progesterona, antes del tratamiento con estrógenos, o sea lo mismo que sucede en condiciones fisiológicas, no acorta el tiempo preciso para obtener la respuesta estrógenica en las ovejas sin ovarios. En ovejas cíclicas, bajo condiciones normales de hormonas, estos signos de síntesis y liberación se pueden

observar el D-0, esto es 24 horas después del nivel más alto de estrógenos.

Nos podemos preguntar si en tan corto espacio de tiempo es posible de las condiciones precisas para esa biosíntesis - en el interior de las células, si es posible que madure el producto de secreción y si es posible que se libere en cantidades - precisas hasta el lumen.

Excepto en el momento de la concentración máxima que - ocurre en cada ciclo, los estrógenos también se detectan en la - sangre circulante durante las otras fases del ciclo estral, aunque en muy bajas concentraciones. Como quiera que la progesterona antagoniza a los estrógenos, alcanza niveles suficientes por lo que la síntesis básica de productos secretorios ocurre pero a bajo nivel.

A la luz de los hallazgos de WILLESEN bien solo o con sus colaboradores parece que los productos excretados el D-0 del ciclo se sintetizan durante los primeros días del ciclo previo. La apariencia cristalina típica de los contenidos de los gránulos del tipo de disposición de láminas paralelas, presente principalmente en la fase luteal, puede ser coincidente con esta hipótesis. Como quiera que los gránulos de este tipo y de una fase más avanzada parecen ser las formas más concentradas del producto de secreción puede que inmediatamente después de la liberación se encuentre una concentración relativamente alta de ellos en el líquido del oviducto.

La sospechosa necesidad de un alto nivel de estrógenos que debe aparecer unas 24 horas antes de los calores, puede que proporcione otra explicación a los celos silenciosos, con los -- que suele aparecer la estación reproductora de la oveja y además explicará también la poca fertilidad, o al menos los desacuerdos en cuanto a la fertilidad, que existe después de inducir el es--tro en la estación menos apropiada o estación no apta para la --cria.

Otros aspectos variables a lo largo del ciclo estral -- de la oveja han sido puestos de manifiesto por MILLER y col. -- (1977), que encuentran que la concentración de receptores para -- estradiol y el contenido medio celular del RNA en la carúncula -- del endometrio es máxima en el momento del estro para luego de--clinar paulatinamente hasta el final de la fase luteínica del ci -- clo. En líneas generales lo mismo se puede decir de la concentra -- ción de receptores para progesterona, excepto que la máxima se -- presenta un poco después que la del estradiol. El cambio de este comportamiento endometrial sugiere que cada uno fue estimulado -- principalmente por el estradiol secretado en el proestro y que -- la posterior elevación de secreción de estradiol de la fase lutea del ciclo, especialmente la que tiene lugar los días 3-4, tienen muy poco efecto estimulante sobre el endometrio. Unicamente la -- concentración de receptores de progesterona permanece ligeramen -- te alta el día 5.

Todos los niveles de receptores y actividad metabólica declinan entre los días 5-10 del ciclo, cuando aumenta marcada--



damente la concentración de progesterona y los valores más bajos se encuentran entre los días 10-14 tiempo de máxima concentración de progesterona como ya ha quedado señalado anteriormente. Posiblemente esta disminución de actividad endometrial se deba -- además del incremento de concentración de progesterona, a los -- cambios de flujo de sangre al útero que se observan en esta fase.

La estrecha relación entre cambios de concentración de receptores de estradiol y niveles de RNA y metabolismo proteico en el endometrio es de gran interés ya que estos parámetros es-- tán regulados fundamentalmente por el estradiol y muy poco por -- la progesterona (MILLER, 1976).

En relación con estos hechos MILLER y col. (1977), su-- gieren que el desarrollo del embrión en el lumen uterino, espe-- cialmente en los estadios de morula y blastocito se debe reali-- zar en el período cuando las concentraciones de receptores de es-- tradiol y progesterona, así como contenido medio celular RNA y -- síntesis proteica están en franco declive en el endometrio.

Con el avance de las técnicas electrofisiológicas se -- han conseguido determinar una serie de parámetros en el organis-- mo animal hasta ahora inalcanzables. El útero de la oveja no iba a ser una excepción y así NAAKTGEBOREN y col. (1973) estudian la motilidad de este órgano durante el ciclo estral haciendo énf-- sis sobre los fenómenos eléctricos que están íntimamente relacio-- nados con las contracciones y su propagación por el miometrio, -- los autores piensan que estos estudios electrofisiológicos pue-- den contribuir sustancialmente al conocimiento de los cambios de

modelo de actividad y que proporcionan más y mejor información -- que los registros de cambios de presión que eran los únicos que hasta la fecha de este trabajo se habían realizado.

El estudio, en esencia, consiste en la implantación de electrodos de plata, en cada cuerno uterino, suturados a la pa-- red y debidamente aislados para evitar pérdidas de potenciales -- por difusión. Por los resultados encontrados se puede afirmar -- que los electrodos así dispuestos no afectaban para nada a la -- función tanto ovárica como uterina, a pesar de haber estado im-- plantados más de 12 semanas. La única reacción al implante fue -- la aparición de una cápsula de tejido conectivo sobre los elec-- trodos.

El estudio histológico del útero demostró que la sero-- sa era 3 ó 4 veces más gruesa en el lugar de la implantación. El miometrio no estaba dañado y el endometrio se encontró normal.

La actividad eléctrica del útero ovino varió considera-- blemente a lo largo del ciclo estral. Lo más frecuente fue el ha-- llazgo de un modelo difuso de baja amplitud; ésto es, menos de -- 50  $\mu$ V, aunque en ocasiones se observó cierto grado de ritmicidad. De vez en cuando el útero mostró una regular ritmicidad con am-- plitudes grandes, del orden de 250 a 500  $\mu$ V. Los trenes de impul-- sos eléctricos tenían una duración de unos 8-10 segundos, mien-- tras que los intervalos entre ellos mostraron una amplia varie-- dad, con duraciones de 8 a 20 segundos. Los trenes de descargas se observaron primero en los electrodos tubales y algunos segun-- dos después en los electrodos situados en el cuerpo uterino. La

actividad eléctrica pasó sobre el cuerno uterino, desde el extremo tubárico, hasta el extremo cervical y se propagó sobre el cuerno uterino en un período de 2 a 3 segundos. Este modelo se registró primero a los 17 días después del estro y luego corrió a intervalos regulares de 17 días. La máxima actividad eléctrica coincide con el período del estro ya que la duración del ciclo en las ovejas utilizadas (raza Texel) se estableció que dura esos 17 días. Al día siguiente el modelo fué similar pero con períodos de quiescencia absoluta que duraron hasta 5,5 minutos. A menudo, la actividad apareció cerca del cuerpo uterino, propagándose hasta el extremo tubal. En estos casos la dirección de propagación se invirtió.

Durante los días siguientes se observó una rápida disminución de la ritmicidad regular y de las amplitudes de la actividad eléctrica del miometrio después de lo cual la ritmicidad volvió a su normalidad y las amplitudes aumentaron.

Tras un período de inactividad se registró una cierta actividad y otro período de descanso.

Por lo antedicho, parece claro que hay una relación entre un modelo regular y otro de grandes amplitudes, mientras que durante los periodos de actividad difusa, las amplitudes fueron más pequeñas. Las mayores amplitudes, como se ha dicho, se registraron con intervalos de 17 días, coincidentes con la mayor concentración de estrógenos, ya que estas hormonas estimulan la conducción celular. Si las propiedades de conducción entre células vecinas son óptimas, el estímulo se propaga muy rápidamente y se

inician contracciones coordinadas. La mala conducción permite solo contracciones locales de pequeños grupos de células musculares.

El hecho de que la propagación de las ondas de contracción espontáneas se invierta de peristalsis a antiperistalsis puede tener una interpretación funcional, lo que puede ser de importancia para el transporte de semen después de la copulación. La subsiguiente desaparición de la actividad y la extrema quiescencia en la mitad del ciclo; esto es, en el tiempo de implantación, son condiciones que favorecerían las circunstancias para la nidación de los blastocitos.

Sin duda alguna los cambios hormonales que acontecen durante el ciclo estral de la oveja tienen su influencia más o menos directa sobre el flujo de sangre a ciertos órganos especialmente a aquellos que integran el aparato reproductor. MOOR y BRUCE (1976) hacen un estudio exhaustivo de estos cambios en los días que preceden al estro ya que de los datos por ellos consultados creen que es el momento más idóneo para observar esos cambios y encuentran los resultados que por su interés transcribimos en la siguiente tabla (página 44).

Las medidas de flujo sanguíneo están expresadas en  $\text{ml} \times \text{min.}^{-1} \times 100 \text{ g}^{-1}$ .

Los valores de la tabla indican valores medios  $\pm$  error estandard.

Lo más reseñable de estos datos es la fuerte caída de la concentración de progesterona y el aumento de peso y flujo de la mayoría de los órganos del aparato reproductor de la oveja.

	Días del ciclo estral		
	14	15	16
Nº de ovejas observadas	7	6	10
Peso de los animales (kg)	33 $\pm$ 2	35 $\pm$ 1	35 $\pm$ 1
Presión arterial (mm de Hg)	72 $\pm$ 4	80 $\pm$ 6	82 $\pm$ 4
Ritmo de pulso (por minuto)	107 $\pm$ 8	103 $\pm$ 9	100 $\pm$ 6
Progesterona plasmática (ng/ml)	3,3 $\pm$ 0,5	3,2 $\pm$ 0,7	0,2 $\pm$ 0,06
- Organos reproductores:			
Peso de la vagina (g)	12,4 $\pm$ 1,1	11,3 $\pm$ 0,5	12,2 $\pm$ 0,9
Flujo sanguíneo	3,7 $\pm$ 0,6	38,3 $\pm$ 11,1	29,8 $\pm$ 7,5
Peso del cervix (g)	13,5 $\pm$ 1,2	13,1 $\pm$ 0,8	15,1 $\pm$ 0,8
Flujo sanguíneo	4,2 $\pm$ 0,4	43,8 $\pm$ 16,7	37,4 $\pm$ 10,4
Peso del miometrio (g)	27,4 $\pm$ 1,4	25,1 $\pm$ 1,4	34,1 $\pm$ 2,4
Flujo sanguíneo	5,8 $\pm$ 2,7	12,4 $\pm$ 2,8	24,3 $\pm$ 3,7
Peso del endometrio (g)	11,3 $\pm$ 0,7	11,1 $\pm$ 0,7	17,6 $\pm$ 1,5
Flujo sanguíneo	68 $\pm$ 41	154 $\pm$ 47	123 $\pm$ 29
Peso del oviducto (g)	0,38 $\pm$ 0,05	0,42 $\pm$ 0,08	0,56 $\pm$ 0,03
Flujo sanguíneo	7,3 $\pm$ 1,1	14,8 $\pm$ 2,5	28,5 $\pm$ 5,3
Peso total de ovarios y útero(g)	67 $\pm$ 4	63 $\pm$ 2	82 $\pm$ 5
Flujo sanguíneo	28 $\pm$ 7	59 $\pm$ 8	50 $\pm$ 7
- Otros órganos:			
Peso del cerebro (g)	93 $\pm$ 3	87 $\pm$ 3	89 $\pm$ 3
Flujo sanguíneo	184 $\pm$ 16	184 $\pm$ 16	190 $\pm$ 12
Peso de la hipófisis (g)	0,62 $\pm$ 0,04	0,66 $\pm$ 0,04	0,66 $\pm$ 0,04
Flujo sanguíneo	59 $\pm$ 15	95 $\pm$ 26	81 $\pm$ 9
Peso del corazón (g)	175 $\pm$ 7	183 $\pm$ 4	176 $\pm$ 8
Flujo sanguíneo	85 $\pm$ 16	37 $\pm$ 9	59 $\pm$ 7
Peso de un riñón (g)	58 $\pm$ 4	65 $\pm$ 4	63 $\pm$ 5
Flujo sanguíneo	163 $\pm$ 20	182 $\pm$ 11	186 $\pm$ 20

### 3.1.- CONTROL NEUROENDOCRINO DEL CICLO ESTRAL

Uno de los aspectos más intrigantes de la reproducción es la fertilidad reversible que se presenta en la estación de la reproducción. Desde la más remota antigüedad se sabe que "existe una estación para cada cosa... hay un tiempo para nacer y un tiempo para morir..." (Eclesiastes, cap. 3, versículo 1-2).

En los últimos años se han conseguido una gran cantidad de conocimientos respecto a los mecanismos neuroendocrinos - que rigen la reproducción estacional en la mayoría de las hembras, siendo el estudio de los procesos de retroalimentación que existen entre las gónadas y las hormonas gonadotrópicas los que mayor atención han recibido y a los que nos vamos a referir como - base de los estudios experimentales por nosotros realizados.

En el ciclo reproductor de la oveja se advierten claramente dos estaciones: la de la reproducción y la del anoestro o estación infértil. En la mayoría de las razas ovinas, la primera comienza al final del verano y se caracteriza por la sucesión de ciclos con una duración aproximada de 17 días. La estación anoéstrica comienza al final del invierno y se caracteriza por la ausencia de ciclos ováricos.

En la figura nº 1 se representan esquemáticamente las concentraciones hormonales y el tamaño del folículo a lo largo - del ciclo estral de la oveja, según LEGAN y KARSCH (1979).

El ciclo en la oveja se puede dividir en dos fases: una luteica con 12-13 días de duración y un periodo preovulatorio de 3-4 días. - Las concentraciones de progesterona circulante reflejan el aumento y disminución de la actividad secretoria del cuerpo luteo que está gobernada por una interrelación entre factores estimulantes procedentes de la hipófisis y factores inhibitorios procedentes del útero. La fluctuación del contenido de estrógenos, principalmente estradiol circulante deriva casi exclusivamente de los folículos ováricos, varios de los cuales se desarrollan o sufren atresias en el curso del ciclo estral.

La cantidad de hormona luteínica refleja la operación de dos sistemas regulatorios que actúan por separado, un sistema tónico que produce cantidades relativamente bajas y de carácter episódico, de gonadotropinas durante la mayor parte del tiempo - del ciclo y un sistema de oleadas que genera la producción masiva de esta hormona en el periodo preovulatorio. Esta elevación - de la concentración de LH se ve acompañada de un cambio comportamental que precede a la ovulación durante aproximadamente 24 horas.

La ovulación es el punto culminante del ciclo de la reproducción en cualquier hembra; sin embargo, no es un hecho aislado ya que requiere la sincronización de numerosos pasos que inclu--yen la preparación y madurez del folículo o folículos destinados a ovular, la secreción de hormonas esteroideas por parte del ovario y una serie de cambios neuroendocrinos resultantes de la secreción de gonadotropinas. Fijemos nuestra atención sobre uno de

los hechos más principales de esta mezcla de acontecimientos que es

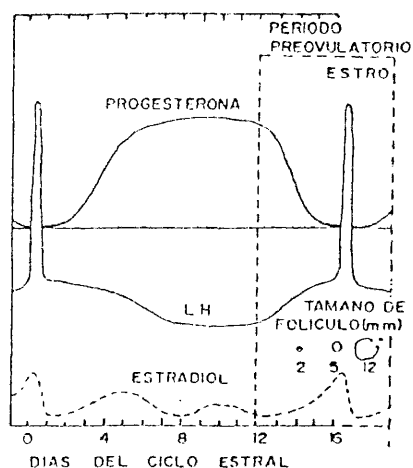


Fig. 1

sultado la liberación de gona dotropina luteinizante (LH). El ovario, por su parte, tras el estímulo de esta hormona - junto con la estimulante del folículo (FSH) y la prolactina es capaz de sintetizar y - secretar hormonas esteroides. Estas hormonas (estrógenos, andrógenos y progesterona) - tienen además de sus efectos sobre los tejidos periféri-- cos la importante función de

la elevación de la concentra- ción de hormona luteinizante (vease figura 1) por cuanto - ésto es la última señal que - recibe el ovario antes de des- prenderse el óvulo.

Las neuronas neurose cretoras del hipotálamo (figura 2) producen la hormona liberado ra de la hormona luteinizante - (LHRH) que se vierte al sistema portahipofisario dando por re--

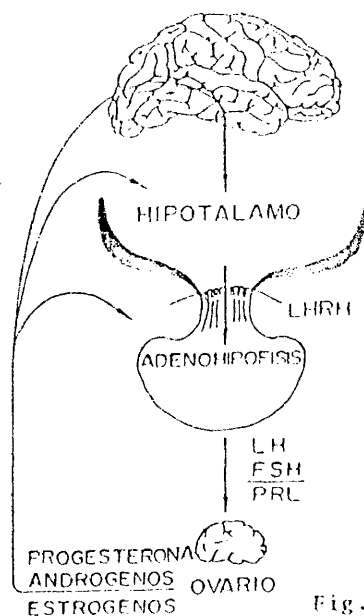


Fig. 2



regular mediante retro-alimentación la secreción de hormonas gonadotropas, lo que resulta un tanto complejo por cuanto a los múltiples lugares de interacción retroalimentaria de los esteroides: áreas extrahipotalámicas del sistema nervioso central (que a su vez influyen sobre el hipotálamo), el hipotálamo y la hipófisis.

En este sistema el impacto final de la ovulación es una breve, pero masiva, secreción de LH desde la adenohipófisis y que se conoce como oleada de LH. Los hechos que se desarrollan para que se produzca esta elevación hormonal han confundido e intrigado a los neuroendocrinólogos de la reproducción en los últimos años.

TURGEON (1980) se hace la siguiente pregunta: ¿Es la oleada de LH el resultado de un aumento de secreción de LHRH ó un aumento de respuesta ó sensibilidad a la hormona hipotalámica? O quizá más realísticamente ¿Cuales son las contribuciones relativas de estos dos fenómenos propuestos para aumentar la secreción de LH y cuales son los mecanismos afectados?. Veamoslo con cierto detalle:

### 3.1.1.- LHRH: Localización y elementos de control

Ya se sabe que el hipotálamo controla la función de la adenohipófisis y, específicamente, una pequeña región de la parte medio-basal del hipotálamo es la esencial para el mantenimiento de la secreción de LH. En esa región basal se incluye la eminencia media, núcleo caudado, núcleo ventromedial y parte de la zona hipotalámica anterior, recibiendo todo el conjunto el --

nombre de área hipofisiotrópica. Otra zona implicada en el control de la LH, particularmente en la oleada de LH, es el área preóptica y el núcleo supraquiasmático. Una combinación de estudios de estímulo y lesión son los que han contribuido más notablemente al conocimiento del papel de estas estructuras en el control de la ovulación (BARRACLOUGH, 1973). En el Departamento de Endocrinología del Institut für Tierzucht und Tierverhalten de Mariensee (República Federal de Alemania) actualmente se están haciendo en cerdos un buen número de experimentos encaminados a conocer el papel que tienen las estructuras límbicas en el control de liberación de la LH (ELLENDORFF, 1980). No obstante la localización de la LHRH en el encéfalo no ha sido tarea fácil y quizá nos atrevemos a decir que aun no está concluida. Las técnicas de microdisección de Palkovits, el radioinmunoanálisis, la determinación de anticuerpos por fluorescencia y la reacción peroxidasa-anti-peroxidasa son otras tantas técnicas empleadas con más o menos éxito en la identificación de las hormonas hipotalámicas.

En la rata (y permitasenos que tengamos que acudir a los conocimientos que se tienen en los animales de experimentación más pequeños, ya que en la oveja aun no ha sido estudiado, pero los datos que aporta TURGEON (1980) son tan recientes y tan valiosos que no podemos por menos de incluirlos) los cuerpos celulares de las neuronas que contienen LHRH se encuentran principalmente en dos zonas:

- 1) en el área preóptica medial e hipotálamo anterior, y
- 2) en el hipotálamo tuberal, principalmente núcleo arqueado y núcleo periventricular adyacente.

Estas neuronas que contienen LHRH son parte de aquellas denominadas antiguamente sistema neurosecretor parvicelular y tienen la mitad de tamaño que el de aquellas que producen oxitocina y vasopresina. La eminencia media por lo general está exenta de cuerpos celulares pero contiene alrededor del 50% de la LHRH hipotalámica gracias a sus proyecciones axonales, fundamentalmente del núcleo arqueado. También existen células endodimales, tanicitos, que asientan en la eminencia del III ventrículo capaces de contener LHRH (ZIMMERMAN, 1976). Estos tanicitos que contienen hormona de liberación hipotalámica también se han encontrado en otro órgano circumventricular, el órgano vasculosum de la lámina terminal, precisamente este componente del sistema circulatorio hipotalámico está recibiendo actualmente una gran atención si bien los hallazgos que hasta el momento se tienen no son muy concluyentes.

La lámina terminalis es una especialización neurovascular en el extremo rostral del III ventrículo, contiene neuronas que rodean un neuropilo que presenta células gliales, axones terminales y una red capilar, habiéndose considerado como un verdadero sistema porta (AMBACH y col., 1978).

El otro sistema porta del hipotálamo, éste es el sistema porta hipofiseal, es desde luego la unión anatómica esencial -



que proporciona la principal ruta de paso a las hormonas liberadoras del hipotálamo hasta la hipófisis anterior. En ambos sistemas porta el flujo es bidireccional.

La liberación y/o síntesis de LHRH puede verse afectada por neurotransmisores y esteroides sexuales. Los neurotransmisores catecolaminérgicos han sido considerados como factores implicados en la secreción de LHRH. El sistema dopaminérgico está conectado en el hipotálamo basal, con los cuernos celulares del núcleo arqueado y zonas vecinas con proyecciones a la eminencia media y al lóbulo neural, sus terminaciones intervienen en la secreción de LHRH. Existe dentro del hipotálamo otro sistema dopaminérgico, se trata de células que partiendo del hipotálamo posterior se proyectan en la región dorsal hipotalámica y en la región supraquiasmática.

Contrastando con el sistema dopamina, el sistema noradrenérgico tiene su origen fuera del hipotálamo: parte, fundamentalmente del locus coeruleus, grupo tegmental lateral y formación reticular, entra en el hipotálamo a través del haz encefálico antero medial y termina en áreas preóptica y anterior del hipotálamo, región media eminencia-núcleo arqueado y a lo largo de todo el sistema periventricular. Ambos sistemas tienen solapamientos considerables con la producción de LHRH. La evidencia morfológica de una interacción potencial entre dopamina, norepinefrina y terminales que contienen LHRH en la eminencia media está avalada por los estudios de recambio de las neuronas catecolaminérgicas coincidentes con cambios del estado endocrino (FUXE y col., 1978).

Es importante indicar que, como se sabe, tanto el hipotálamo como la hipófisis secretan más de una hormona y que muchos de los sistemas de control neural para estas diversas hormonas - están canalizados a través del hipotálamo basal hasta la eminencia media y que la manipulación de un sistema puede afectar la - operación del otro. Esta interacción deberá ser tenida en cuenta cuando se considere la complejidad del papel de los neurotransmisores en el control de la LHRH.

Los otros elementos implicados en el control de la LHRH son los esteroides sexuales, especialmente los estrógenos. Mediante técnicas autorradiográficas y de acoplamiento nuclear se han detectado neuronas concentradoras de esteroides en el núcleo arqueado y área periventricular así como en las zonas anterior y - preóptica del hipotálamo (McEWEN, 1976). También existen grupos neurales concentradores de estrógenos en la hipófisis anterior. En la región hipotalámica basal y en la adenohipófisis se encuentran asimismo receptores de progesterona, si bien para su actuación se precisa de la sensibilización previa por parte de los estrógenos (KATO y ONOUCHI, 1977).

Otra faceta del metabolismo de los estrógenos que tiene lugar en el hipotálamo es la hidroxilación en el carbono 2 para formar catecolestrógenos que pueden servir como nexos de unión bioquímica entre estrógenos y catecolaminas. Actualmente se está hablando mucho del papel de los catecolestrógenos en la mecánica neuroendocrina si bien los conocimientos que se tienen hasta ahora no son demasiado concluyentes, precisándose de una mayor in--



vestigación sobre el particular.

### 3.1.2.- Secreción preovulatoria de LHRH

Estudiemos con atención los mecanismos implicados en la elevación de concentración de LH preovulatoria.

El modelo de secreción de la LH durante todo el ciclo estral está controlado por mecanismos de retroalimentación positivos y negativos. La elevación preovulatoria de LH (oleada de LH) es consecuencia de una retroalimentación positiva por parte de los estrógenos ya que la concentración de éstos en el suero responde a un modelo de concentración-duración muy efectivo durante el diestro y proestro. Hay que hacer notar que la apropiada duración del estímulo estrogénico es muy importante, aunque por el momento no ha sido cuantificada para la oveja.

Basándose en el hecho de que los estrógenos inducen la liberación de LH preovulatoria y de que existen receptores estrogénicos tanto en el hipotálamo como en la hipófisis se puede afirmar que los estrógenos tienen, cuanto menos, un papel relativo en aumentar la secreción de LHRH y un aumento de la respuesta hipofisaria en la oleada de LH. Por otro lado, existe evidencia experimental de que la LHRH interviene en la oleada de la LH. Otro indicador, aunque indirecto, del papel de la LHRH en el aumento preovulatorio de LH lo constituye el hecho del aumento de secreción de LHRH con relación a la oleada de LH. Sin duda, el determinar las concentraciones de LHRH antes y después de la oleada sería decisivo para determinar su papel; sin embargo, uno de

los principales problemas es su corta vida media, que es de 3,5 minutos; por otro lado, el trayecto que tienen desde su lugar de formación hasta los lugares efectores es muy corto y en definitiva la concentración es extremadamente baja. A pesar de estos inconvenientes SARKAR y col. (1976) han conseguido determinar concentraciones antes de la oleada de LH.

Estos hallazgos demuestran una correlación entre aumento de secreción de LH y aumento de secreción de LHRH y sugieren, también, que los efectos estimulantes de los estrógenos sobre la secreción de LH están acompañados, al menos en parte, de un considerable aumento de la secreción hipotalámica de LHRH.

Una serie de trabajos experimentales realizados en la rata demuestran que es el área preóptica la más importante en esta correlación de aumento de LHRH de tal forma que al estimular dicha zona se encuentra un aumento proporcional de la concentración de hormona. Por otro lado, los trabajos experimentales de interrumpir la conexión del área preóptica y el propio hipotálamo hacen que no exista esa elevación de LH preovulatoria.

GOODMAN (1978) indica a este respecto: 1º/ las altas concentraciones de estrógenos no son por si mismas suficientes para producir la oleada de LH, 2º/ la región medio-basal del hipotálamo no es el lugar donde se efectúa la acción de retroalimentación positiva de los estrógenos, y 3º/ los estrógenos pueden actuar a nivel del área preóptica para inducir a la liberación de LH.



### 3.1.3.- Respuesta hipofisaria a la LHRH

Hasta aquí hemos venido considerando a la hipófisis como un órgano pasivo que responde a una señal dada por la LHRH de una forma constante independientemente de su anterior condición hormonal.

La hipófisis, en un estado hormonal dado, reacciona a la respuesta pulsátil de LHRH con una relación dosis-respuesta - tanto "in vitro" como "in vivo". Sin embargo, el grado de efecto determinado por un estímulo dado varía de acuerdo con el cambio hormonal de su entorno. Así se encuentra que la respuesta máxima de la hipófisis a la LHRH corresponde al momento del ciclo en -- que ocurre normalmente la oleada de LH, correspondiendo también al tiempo de máxima secreción de estrógenos.

A tenor de los experimentos llevados a cabo por TURGEON (1980) "in vitro" y después de las consideraciones tenidas en -- cuenta se puede concluir que: con relación al aumento de secre-- ción de LHRH; este aumento está relacionado con un efecto de re-- troalimentación positivo de los estrógenos a nivel del hipotálamo. Con relación al aumento de respuesta a la LHRH: dada la alta sensibilidad de determinados territorios a responder a la LHRH -- la evidencia experimental es de que pequeños aumentos de secre-- ción de LHRH se traducen en altos incrementos de LH; por tanto los sucesos acontecidos en la hipófisis de la hembra antes de la ovulación se comportan como verdadero amplificador de la señal -- recibida del hipotálamo.



### 3.1.4.- Interrelación entre LH y otras hormonas

Continuando con el estudio de la hormona luteinizante, después de analizar esas confluencias hipotalámicas y tratando de relacionar los cambios de esta hormona con los acontecidos en otras diremos que en un sentido simplista el ciclo estral de la oveja se puede considerar como una secuencia de sucesos encadenados, cada uno de los cuales ocupa un lugar preponderante, tanto en el espacio como en el tiempo, que se necesita de su presencia para el desarrollo del siguiente paso e incluso de la totalidad de los aconteceres así como también para el desarrollo del ciclo siguiente. La interrupción de cualquiera de ellos puede ocasionar la terminación del ciclo.

Los esquemas que se incluyen a continuación proporcionan una idea clara y gráfica de lo expuesto (figura 3).

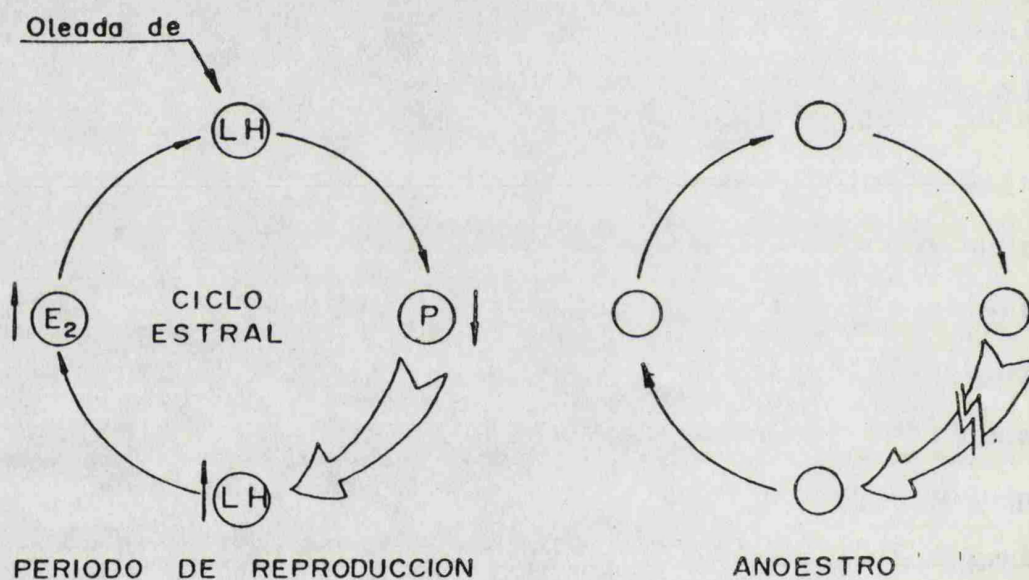


Fig. 3

Aproximadamente 48-60 horas antes de la aparición de la oleada de LH, la progesterona circulante desciende de forma rápida como consecuencia de la inmediata regresión del cuerpo lúteo. Intimamente asociado con este descenso de progesterona nos encontramos con un progresivo aumento de la LH, alcanzando niveles 5 veces mayores de los valores basales, en el momento de alcanzarse la oleada de LH preovulatoria ya citada. Esta elevación refleja un aumento en la frecuencia pulsátil de las descargas de LH y constituye un aumento de la secreción tónica de LH. Ese aumento sustancial de la secreción de esta hormona, que se expande a un período de casi 48 horas se ve acompañado de un aumento de casi cinco veces, del estradiol circulante, resultante del rápido aumento de los folículos. Por su parte ese aumento de concentración estrogénica conduce a la oleada preovulatoria de LH, como hemos visto anteriormente.

Basándose en las interrelaciones hormonales observadas durante el período preovulatorio y que se resumen en: a) relaciones inversas entre LH y progesterona, y b) aumento paralelo de LH y estradiol; se ha propuesto una hipótesis de trabajo para tratar de explicar el mecanismo de control de los sucesos que conducen a la ovulación y que en esencia consiste en que la progesterona secretada por el cuerpo lúteo ejerce una inhibición dominante de la secreción tónica de LH; por ello, al disminuir la concentración de progesterona, consecuente a la luteolisis se permite un aumento de esa secreción tónica de LH. Por otro lado y concomitantemente, la elevación de la LH estimula la secreción

del estradiol. El carácter sostenido del aumento de la LH (48 horas) proporciona el ímpetu necesario para que el estradiol circulante alcance el umbral necesario para "disparar" la oleada de LH. Esto conduce a un nuevo ciclo, comenzando con la ovulación y formación del cuerpo luteo.

Durante el tiempo que transcurre entre la formación -- del cuerpo luteo y su regresión se mantienen altos niveles de -- progesterona y bajas concentraciones de LH y estradiol. Al final del ciclo tiene lugar la luteolisis, disminuye drásticamente la concentración de progesterona y se repite de nuevo la secuencia.

Es importante indicar que el aumento paralelo de LH y estradiol impide la posibilidad de que este último sea un potente inhibidor de la secreción de LH durante el período preovulatorio; este hecho puede ser crítico al considerar las bases de la reproducción estacional que más adelante estudiaremos.

¿Existen razones suficientes para considerar que el -- primer paso de la secuencia es la caída de la concentración de -- progesterona, que conduce al aumento de la secreción tónica de -- LH?.

En primer lugar los niveles fisiológicos séricos de -- progesterona pueden ejercer una potente inhibición de la secreción tónica de LH en la oveja, efecto que se ve reforzado por -- los niveles basales de estradiol. Además el efecto de la progesterona es dependiente de la dosis, lo que es importante a la hora de considerar las relaciones inversas entre concentraciones --

de progesterona y de LH durante el ciclo.

Según los datos aportados por LEGAN y col. (1979) la mejor evidencia de la importancia de la concentración de progesterona, se obtuvo en varios experimentos en los que el aumento sostenido de la secreción tónica de LH se indujo en la mitad de la fase lutea mediante un proceder experimental que incluía la prematura retirada de la progesterona. Este proceder consistió en practicar la ovariectomía el día 8 después de la oleada de LH, lo que produjo un rápido y prematuro descenso de la concentración de progesterona circulante y un rápido aumento (del orden de 4-5 veces) de la LH, que se mantuvo aproximadamente durante 48 horas, duración considerablemente similar a la del aumento de la secreción tónica de LH, que ocurre en el momento de la luteolisis espontánea. Por otro lado, el aumento de LH se acompañó de un incremento paralelo del estradiol circulante, suficiente para iniciar el aumento de LH, seguido de ovulación.

Si se logra mantener el nivel de progesterona que existe en la mitad de la fase lutea mediante la administración de -- hormona exógena, no se produce el aumento prematuro de secreción tónica de LH, siendo precisamente estos hechos los que podemos considerar como el primer paso del ciclo, que conducen, por otra parte, a la aparición de otros acontecimientos.

En efecto, el incremento de secreción de LH estimula la elevación del contenido de estradiol según pudo comprobarse en el experimento anteriormente citado así como en los de BAIRD y col. (1978) que observan un marcado aumento de la secreción --

ovárica de estradiol a los pocos minutos de elevarse el contenido de la LH, de tal forma que estos hallazgos han conducido a -- considerar que el incremento de la frecuencia de las eyecciones pulsátiles de LH entre las luteolisis y la oleada de LH genera -- la elevación de estradiol preovulatorio.

La íntima relación entre contenido de LH y estradiol -- proporciona una evidencia circunstancial del segundo paso de la secuencia. No obstante, no existe evidencia definida suficiente para afirmar que el aumento fisiológico de la secreción tónica de LH sea estímulo necesario y suficiente para elevar el contenido de estradiol antes de la ovulación. Se ha demostrado que la secreción ovárica de estradiol en la oveja puede acrecentarse -- por la administración de LH. Por otro lado, la administración de gonadotropina coriónica humana, un estimulante exógeno parecido a la LH, produce un aumento del estradiol circulante en la oveja anoéstrica y aunque esta elevación del estradiol fue algo más pe queña que la que ocurre normalmente durante el período preovulatorio durante la estación de la reproducción, era de suficiente magnitud y duración como para liberar una oleada de LH seguida -- de ovulación.

Los hechos reseñados nos proporcionan una base sólida para afirmar que el aumento sostenido de secreción tónica de LH conduce a la elevación preovulatoria de estradiol y que ésto con duce, automáticamente, a los siguientes acontecimientos preovulato-- rios.

En efecto, existen suficientes datos experimentales para afirmar de una vez por todas que la elevación de estradiol circulante es la señal ovárica para que aparezca la oleada de LH pre-ovulatoria.

La aparición de esa oleada de LH completa la secuencia de sucesos endocrinos preovulatorios, de tal forma que cada paso en esta secuencia de acontecimientos conduce al siguiente y que todos ellos son precisos para completar fisiológicamente el ciclo estral en la oveja. Sin embargo, con estos razonamientos no se explica el mecanismo mediante el cual se interrumpe el ciclo, conduciendo al anoestro.

Según los datos de LAND y col. (1979) la duración de la secreción de LH es mayor durante la época de la reproducción que durante el anoestro y que los cambios en la actividad espontánea del eje hipotálamo-hipófisis puede que sean los responsables de los cambios estacionales en la secreción de LH independientemente de los efectos modificadores de los esteroides gonadales.



### 3.2.- ESTADO DE ANOESTRO

La mayor parte de los componentes esenciales del eje hi potálamo-hipófisis-gónadas permanecen funcionales en las ovejas - en la estación del anoestro. Se pueden observar desarrollos foli- culares, producción de esteroides e incluso capacidad de ovula- ción; se continúan secretando gonadotropinas hipofisarias y puede demostrarse fácilmente la existencia de efectos de retroalimenta- ción, tanto positivos como negativos, sobre la secreción de gona- dotropinas. No obstante los ciclos estrales desaparecen y como he- mos dicho anteriormente la interrupción de cualquier paso en el - circuito cerrado, que representamos en el esquema (figura 3), se- rá suficiente para terminar con la ciclicidad. Veamos ahora donde se puede interrumpir ésta.

La oleada de LH preovulatoria y espontánea no aparece - durante el anoestro. ¿Es posible que el anoestro surja por un cam- bio en el sistema de producción de LH de tal forma que sea inca- paz de responder al aumento preovulatorio de estradiol?. Los estu- dios de LAND y col. (1976) trabajando con ovejas ovariectomizadas y con tratamiento sustitutivo hacen pensar que los estrógenos, du- rante el anoestro, son menos efectivos para inducir la oleada de LH preovulatoria. No obstante, estos hallazgos hay que considerar los con cierta cautela por cuanto la terapéutica sustitutiva, de todos es conocido, no se comporta como la fisiológica; por otro - lado, la ovariectomía prolongada puede ocasionar cambios irrever- sibles de difícil interpretación. No obstante la evidencia real - respecto a la causa del anoestro es el preguntar si la elevación

preovulatoria de estradiol de 2 a 10 pg/ml es suficiente para inducir la oleada de LH durante la estación de anoestro en ovejas intactas. De los resultados de LEGAN y KARSCH (1979), que encuentran una elevación de 3 a 7 pg/ml de estradiol, parece deducirse que sí es suficiente por cuanto estos autores observaron con esa elevación una oleada de LH y posterior ovulación, indicando así que el mecanismo de la LH en la oveja no se hace menos sensible al estradiol durante el anoestro.

Es preciso pues hacerse otra pregunta ¿Será el anoestro el resultado de un cambio en los centros que controlan el comportamiento estral de tal forma que la elevación preovulatoria de estradiol no sea suficiente para la inducción del estro?. LEGAN y --col. (1979) indican que según los resultados que les ha comunicado uno de sus colaboradores (GOODMAN, comunicación personal, sin publicar), el anoestro es muy probable que no sea la consecuencia de un cambio de la respuesta comportamental.

¿Será el anoestro el resultado de una disminución de la capacidad del folículo para responder a la secreción tónica de LH sin previa elevación de estradiol?. Los hallazgos de LEGAN y ---KARSCH (1979) indican que durante el anoestro no se observa aumento de la concentración de estradiol circulante; sin embargo, es poco probable según estos autores, que el folículo ovárico no responda correctamente a la LH, si bien estas observaciones no excluyen la posibilidad de que exista un sutil desvío en la capacidad del folículo para responder a la LH, de tal forma que un aumento de la secreción de esta hormona, como el que acontece en la regre



si3n lutea, no sea suficiente est3mulo. Por su parte SCARAMUZZI y BAIRD (1977) encuentran que el aumento de ritmo de secreci3n de estradiol ov3rico, que sigue a las descargas puls3tiles y discretas de LH durante el anoestro, es tan grande, o mayor, que el que ocurre durante la estaci3n de reproducci3n. Parece evidente que el fol3culo no disminuye su capacidad de respuesta a la LH en su fase de anoestro.

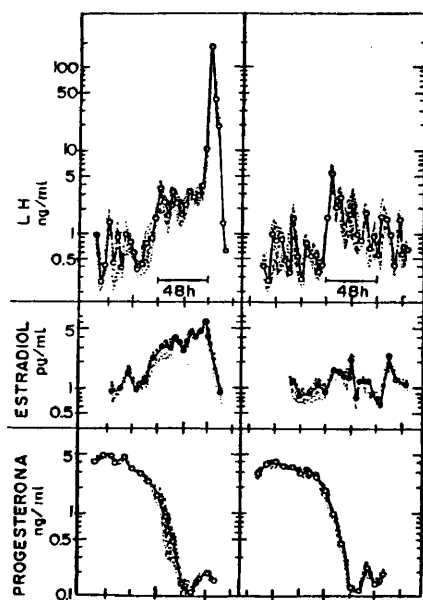


Fig. 4

De lo anteriormente expuesto se deduce que la causa primaria del anoestro estacional no es la falta de oleadas de LH, ni la ausencia de la elevaci3n de estradiol ni la falta de comportamiento estral. Podemos especular con que el anoestro sea debido a la ausencia de un aumento sostenido de la secreci3n t3nica de LH. A la luz de los numerosos experimentos que se han realizado al respecto parece deducirse que, efectivamente aunque persiste una secreci3n puls3til de LH durante

el anoestro, que consecuentemente produce breves episodios de elevaci3n de esta hormona, estos aumentos no persisten tiempo suficiente como sucede en la secreci3n t3nica de LH en el ciclo estral.

La figura 4 tomada del trabajo de LEGAN y KARSCH (1979)

es lo suficientemente demostrativa para aclarar lo que venimos discutiendo.

En la parte de la izquierda se representan las concentraciones de LH, progesterona y estradiol, en muestras obtenidas en los últimos ciclos estrales de la estación de reproducción (de mediados de enero a mediados de marzo), mientras que en la parte derecha se representan las concentraciones de los mismos parámetros durante la fase de anoestro.

Las curvas de concentración de progesterona puede observarse que son virtualmente idénticas. Sin embargo, la duración -- del pico de concentración de LH es mucho mayor en las muestras obtenidas en el período de reproducción que las que se encuentran -- en el anoestro, y en cuanto al estradiol, las concentraciones en estas mismas ovejas son menores que en las cíclicas por cuanto -- falta el estímulo de la LH.

Se puede afirmar, casi con toda certeza, que el anoestro es el resultado de la ausencia de aumento sostenido de la secreción tónica de LH.

Sin duda esta explicación puede ser satisfactoria, pero ¿Cuales son los mecanismos que evitan el aumento preovulatorio de secreción de LH durante el anoestro?. Trataremos de responder a -- esta pregunta. Cada elevación de concentración de estradiol preovulatoria, durante la estación de reproducción, parece ir acompañada de una elevación paralela de la LH, relación ésta que incluye la posibilidad de que el estradiol sea un potente inhibidor de "

la secreción tónica de LH durante esa estación. Sin embargo, durante el anoestro una elevación inducida del estradiol se ve acompañada de una disminución de la concentración de LH circulante. Esta relación inversa sugiere que el estradiol puede comportarse como un esteroide con fuerte potencial negativo de retroalimentación durante el anoestro.

HOFFMANN en 1972 sugirió, en un maravilloso trabajo presentado al IV Congreso Internacional de Endocrinología, Washington, que la reproducción estacional es el resultado de cambios inducidos por el fotoperíodo en la sensibilidad del eje hipotálamo-hipófisis con una acción negativa en los mecanismos de retroalimentación de los esteroides gonadales, aunque esta hipótesis no clarifica de una forma terminante como esos cambios de sensibilidad pueden afectar al ciclo estral de la oveja.

SANDRA LEGAN y FRED KARSCH (1979), basándose en los acontecimientos comentados del ciclo estral, indican que el anoestro se puede interpretar con facilidad como una respuesta elevada a la acción de retroalimentación negativa del estradiol (E) sobre la LH, estableciéndose el circuito negativo (B) de la Figura 5. El descenso, no demasiado grande, de progesterona (P) conduce a un aumento sostenido de la secreción tónica de LH. El circuito A de la misma figura representa los acontecimientos esquematizados que se encuentran en la estación de reproducción.

A esta propuesta es necesario añadir que la respuesta a la acción de retroalimentación negativa del estradiol decrece al

final del anoestro, con lo que se permite la aparición del paralelismo entre concentraciones de LH y estradiol y la consiguiente aparición de los ciclos estrales normales.

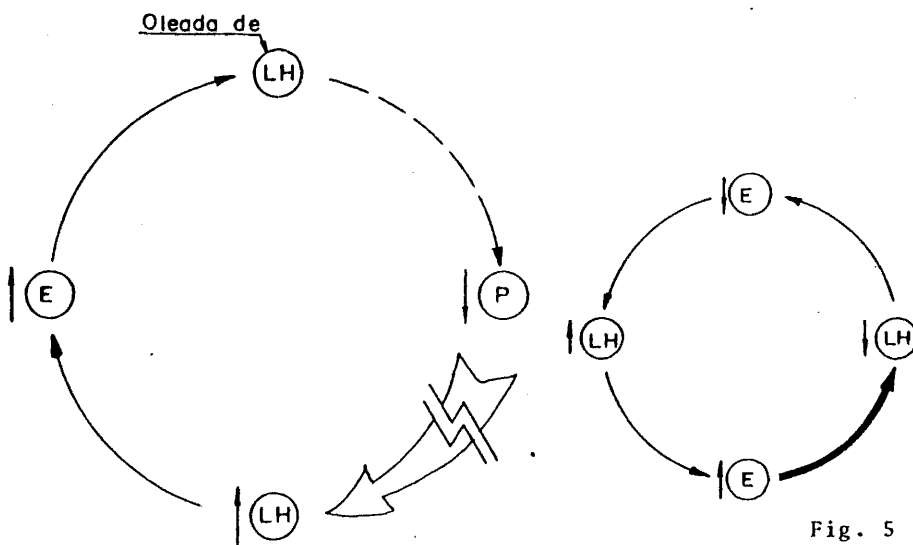


Fig. 5

El esquema expuesto solamente será aceptable si pueden satisfacerse los siguientes criterios: 1) ¿existe un cambio estacional en la respuesta a la acción de retroalimentación negativa del estradiol sobre la secreción pulsátil de LH en la oveja?. 2) ¿estos cambios coinciden con las transiciones entre las estaciones de reproducción y la de anoestro?, y 3) ¿los cambios de respuesta al estradiol son dictados por los cambios del fotoperíodo, factor de gran importancia, que gobierna el carácter estacional de la reproducción de la oveja?.

Con respecto al primer punto, los hechos del siguiente experimento demuestran la existencia de un cambio estacional en respuesta a los estrógenos: ovejas ovariectomizadas fueron implantadas con estradiol de tal forma que se mantuvieron niveles normales de estradiol sérico durante la fase lútea. Los niveles séricos de LH alcanzaron valores similares a los encontrados en ovejas sin tratar con estrógenos, pero ovariectomizadas, durante el otoño y principios del invierno. Sin embargo, en el mes de febrero esas concentraciones bajaron notablemente hasta alcanzar valores indetectables permaneciendo así hasta el mes de agosto en que volvieron a elevarse (LEGAN y col., 1977). Estos cambios de la LH circulante ocurrieron independientemente del nivel sérico de estradiol, debido a los implantes, que permaneció constante; esto indica que los cambios de LH no se deben a los cambios de la depuración metabólica del estradiol. Sin embargo, el cambio estacional de la LH no refleja necesariamente un cambio de respuesta al esteroide por cuanto el mecanismo de liberación de LH puede ser independiente del esteroide. No obstante el examen de los niveles de LH a lo largo de todo el año, en ovejas ovariectomizadas, pero no implantadas, revelaron que las fluctuaciones estacionales de la LH requieren la presencia de estradiol. Estos hallazgos demuestran que en la oveja, existe un marcado cambio estacional en respuesta a la acción del mecanismo de retroalimentación negativo del estradiol sobre la secreción tónica de LH.

En cuanto al segundo punto, esto es, la coincidencia de cambios en respuesta al estradiol con transiciones entre las esta

ciones de reproducción y de anoestro, es evidente que la aparición de la estación de anoestro tiene lugar en el momento de aumento de la respuesta al estradiol, mientras que la estación de reproducción coincide con la disminución de esa respuesta al estrógeno.

Por lo que se refiere al tercer punto, se ha demostrado que la disminución de los fotoperíodos (disminución de horas luz) que tienen lugar al final del verano son estimulantes e inducen a la aparición de la estación de reproducción; el incremento del fotoperíodo (aumento de horas luz) al final del invierno se comporta como inhibidor y consecuentemente aparece el anoestro.

En ensayos realizados con ovejas en las que se forzaba el fotoperíodo artificialmente o se acortaba de la misma forma, (16 horas de luz y 8 de oscuridad con otros períodos de 8 horas de luz y 16 de oscuridad). Los períodos cortos de luz estaban relacionados con la estación de reproducción y altos niveles de LH; por el contrario, los períodos largos de luz se asociaron con el anoestro y niveles bajos de LH.

Estas observaciones dejan poca duda de que la respuesta del eje hipotálamo-hipófisis al efecto de retroalimentación negativo del estradiol, está gobernado por el fotoperíodo ambiental. También nos indican que el fotoperíodo controla la estación de reproducción al inducir un cambio en la respuesta a la acción de retroalimentación del estradiol.

Con lo antedicho se completa nuestra consideración del control de la estación reproductora en los ovinos; los hechos --- aquí analizados evidencian que el aumento preovulatorio y sosteni- do de la secreción tónica de LH es el punto central sobre el que gira el ciclo estral de la oveja. La ausencia de ciclos estrales, durante el anoestro, es consecuencia de un circuito de retroali- mentación negativa entre el estradiol y la LH que evita la eleva- ción de esta última necesaria para conducir la señal del estra- diol a la oleada de LH.

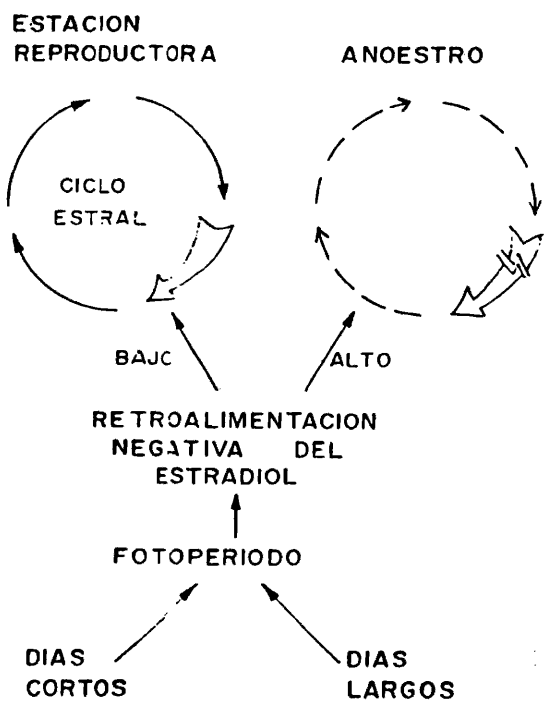


Fig. 6

La aparición - de ciclos estrales, en - la estación de la repro- ducción requiere la in- terrupción de ese circui- to negativo de retrbali- mentación, permitiendo - que se manifiesten las - secuencias preovulatorias ya descritas.

El siguiente - esquema resume los acon- teceres neuroendocrinos que regulan el ciclo es- tral (figura 6).

Durante la estación de la reproducción, la aparición de cada ciclo estral requiere y precisa el desarrollo de una serie de acontecimientos que culminan con la ovulación y que en esencia son:

- a) disminución del nivel de progesterona.
- b) elevación del nivel de LH.
- c) aumento de la concentración de estradiol.
- d) oleada de LH.
- e) aparición de estro.

La interrupción de cualquier punto en esta secuencia -- rompe todo el ciclo y aparece el anoestro.

Se ha centrado mucho la atención sobre el control del modo de secreción de la LH en forma tónica dado que este sistema parece que ocupa el núcleo central de la regulación del ciclo estral y determina el estado de reproducción estacional, en la ovejuela. También es conveniente decir que durante esa estación la progesterona, con la ayuda del estradiol y posiblemente otros esteroides ováricos, juega un papel concomitante para regular la secreción de LH en forma tónica; la desaparición de la progesterona del torrente circulatorio inicia la secuencia de sucesos que conducen a la ovulación. En este sentido, la progesterona puede considerarse como sustancia organizadora de los acontecimientos pre-ovulatorios del ciclo estral de la ovejuela.

El estradiol, por su parte, puede ser considerado como el organizador del ciclo reproductor y en virtud del efecto que



los cambios estacionales tienen sobre el sistema que gobierna la secreción tónica de LH, el estradiol determina la progresión o no de los acontecimientos preovulatorios. Por ello, la secuencia queda permitida cuando la respuesta al estradiol es baja y queda activamente inhibida cuando la respuesta al estradiol es alta. De otro lado, las acciones del estradiol sobre el sistema que gobierna la secreción tónica de LH subordina las influencias del fotoperíodo ambiental sobre el ciclo ovárico y así por medio de alteraciones estacionales entre fotoperíodos estimulantes (días cortos) e inhibidores (días largos) y los consecuentes cambios de respuesta al estradiol, se mantiene el proceso natural de fertilidad en los ovinos.

Cuando ya estaba escrita esta revisión bibliográfica recibimos un trabajo de KARSCH publicado en *Physiologist*, diciembre de 1980, donde hace una revisión perfecta de lo que representa la reproducción estacional de la oveja coincidiendo en muchos aspectos con lo antedicho en este apartado y concluye diciendo que aun permanecen muchas preguntas sin respuesta, preguntas que no solo afectan al sistema de control que opera sobre la oveja sino que se puede extender también a otras especies estacionales; sería un riesgo muy serio el considerar que todas las especies estacionales utilizan el mismo mecanismo que la oveja doméstica, donde cada año se liberan o recogen unos resortes que hacen o no reproducirse. Por el momento, solo se puede especular con que existan ciertas similitudes entre esas diferentes especies.

### 3.3.- ESTEROIDOGENESIS

La población folicular de la oveja se puede dividir en dos grupos, según su capacidad para secretar estrógenos cuando se les aísla de las estructuras adyacentes.

Uno o dos de los folículos más desarrollados producen, por lo general, grandes cantidades de estrógenos y por ello se les puede clasificar como "esteroidogénicamente activos". Los otros folículos producen poca o ninguna cantidad de estrógenos, de ahí que se les clasifique como "no activos".

Según lo estudiado por MOOR y col. (1973) en la oveja, a excepción de uno o dos folículos activos ninguno de los otros es capaz de producir estrógenos después del cuarto día del ciclo en cantidades mayores de 10 a 15 ng/mg de tejido en 24 horas. Esta observación está de acuerdo con el hecho de que la secreción de estrógenos "in vivo" solamente tiene lugar en los grandes folículos activos; sin embargo, los pequeños folículos son capaces de producir pequeñas cantidades de estrógenos entre los días 1 y 4 del ciclo, y esas cantidades son las que sin duda contribuyen a aumentar los niveles de estrógenos que se encuentran en los primeros días del ciclo.

Ahora bien cuando los folículos han sido expuestos a la acción de Gonadotropina de Suero de Yegua Preñada (PMSG) su comportamiento es distinto. En efecto, HAY y MOOR (1975) encuentran que los folículos mayores de 0,2 cm de diámetro son capaces de producir estrógenos cuando el animal ha recibido una inyección de PMSG

aún cuando ésta actúe solamente durante cinco minutos. Si el tiempo de exposición a la gonadotropina se alarga, el aumento de producción de estrógenos no aumenta proporcionalmente.

La explicación a este comportamiento se puede deducir al conocer el modelo de crecimiento y atresia del folículo de la oveja. De los trabajos experimentales realizados en tal sentido es evidente que dentro de una raza en particular, el número y tamaño de los folículos es constante durante el ciclo estral. Según TURNBULL y BRADEN (1977) de 3 a 4 folículos se pueden considerar como la población que crece a diario y ese crecimiento continúa hasta que o bien se hace atrésico u ovula. Dentro de cada clase de tamaño folicular, solo un tercio de los folículos son normales, esto es sin presentar signos de atresia, el resto se encuentran en diferentes estadios de atresia. Parece pues existir un cierto equilibrio entre los folículos que pasan de un cierto tamaño a otro y su desaparición de esa categoría bien por hacerse atrésicos o por pasar a tamaño mayor. Precisamente es en ese tercio de folículos normales donde parece actuar la PMSG que hemos comentado anteriormente.

La producción de estrógenos por el ovario que contiene grandes folículos activos varía considerablemente a lo largo del ciclo estral. La liberación de estrógenos aumenta dando bajos niveles en el momento de la ovulación hasta niveles altos 3 días más tarde.

La secreción de esteroides por parte de los folículos activados y cultivados "in vitro" es paralela al modelo de secre-

ción encontrado "in vivo". La única diferencia estriba en que la testosterona y no su predecesora la androstenodiona, es el principal andrógeno secretado "in vitro".

Durante los primeros cuatro días del ciclo los esteroides predominantes son los estrógenos y andrógenos procedentes de folículos activos cultivados. Es importante reiterar que estos -- dos esteroides aparecen "in vivo", en grandes cantidades, entre -- los días 2 y 4 después del estro; también que en esta fase del ciclo, tanto los folículos grandes como algunos de los pequeños son los productores de la cantidad total de estrógenos. Los folículos grandes aislados durante la mitad de la fase lutea (día 8) secretan continuamente altos niveles de estrógenos. Este modelo de producción de esteroides se altera cuando los folículos son explantados en el estro: se producen muy pocos estrógenos o andrógenos. -- Esos folículos no son capaces de ovular "in vitro" aún cuando se luteinizan y sean capaces de secretar grandes cantidades de progesterona, hidroxiprogesterona y pregnolona. La membrana granulosa de los folículos que se han luteinizado "in vitro" presenta actividad  $3\beta$ -HSD ( $\Delta^5$  -  $3\beta$  - Hidroxiesteroide dehidrogenasa). Lo que recuerda a las células granulosa luteínicas del cuerpo luteo. -- Hay suficientes razones para afirmar que los esteroides  $C_{18}$ ,  $C_{19}$  se secretan principalmente por la teca interna mientras que las -- progestinas  $C_{21}$  se producen fundamentalmente, en la membrana granulosa.

De cualquier forma y como quiera que algunos de los conceptos hasta aquí señalados son controvertidos para otros autores

no debemos dejar de señalar que ante la cierta disparidad de criterios y con el fin de determinar bajo diferentes condiciones hormonales, el origen intrafolicular del estradiol 17 $\beta$ , testosterona y progesterona MOOR (1977) ha realizado un maravilloso estudio -- utilizando folículos maduros, procedentes de ovejas de raza Welsh previamente tratadas con PMSG, cultivados posteriormente en tejidos celulares. Este autor pretende localizar los componentes foliculares responsables de la síntesis de estrógenos, testosterona y progesterona estudiando "in vitro" la capacidad esteroidogénica -- de a) Folículos intactos, b) folículos abiertos pero sin alterar sus paredes, c) capas tecales aisladas, d) células granulosas y e) co-cultivos de capas tecales y capas granulosas.

El resultado más claro del trabajo del citado autor es que la síntesis de estrógenos en los folículos ováricos de la oveja depende de una cooperación entre los elementos tecales y de la granulosa. Resultados éstos que concuerdan con los de otros autores que trabajan con roedores de laboratorio y que en definitiva confirman la hipótesis de FALCK relativa a los tipos de células -- que intervienen en la síntesis de estrógenos.

Otro punto interesante de este estudio es el haber podido comprobar que la liberación de estrógenos se mantuvo a un alto nivel solamente cuando permanecía intacta la relación de los dos tipos de elementos celulares citados. La producción de estrógenos cesó por completo o solo se produjo durante unas horas en aquellos cultivos en que se alteró, de alguna forma, el contacto íntimo entre la teca y la granulosa. Por tanto, es imprescindible que

exista una asociación directa entre los dos tipos celulares para la producción adecuada de estrógenos por parte del folículo.

También es importante anotar, a la luz de los conocimientos que nos proporciona el trabajo de MOOR (1977), que la síntesis de andrógenos se produce fundamentalmente en la teca interna. Los experimentos realizados, por el mismo autor, utilizando andrógenos marcados han indicado la capacidad de las células granulares para aromatizar esteroides  $C_{18}$  "in vitro", si bien dependen, en parte, del tipo de andrógeno que se utilice como sustrato. En efecto, los resultados indican que la testosterona se convierte mucho más fácilmente que la androstenodiona, en estrógenos, por las células granulosas.

Los resultados obtenidos confirman también la idea que ya se tenía de que las células granulosas, después de la luteinización, son las responsables de los altos niveles de progesterona que se encuentran. Sin embargo, ahora se puede afirmar también -- que la liberación de progesterona a partir de la teca es lo suficientemente alta como para tenerse en cuenta en el total de producción de este esteroide por el folículo intacto antes de la luteinización. La posibilidad de la existencia del origen tecal de progesterona en el folículo, en el período preovulatorio, sería compatible con la evidencia histoquímica que sugiere que la enzima  $3\beta$  - hidroxisteroide dehidrogenasa está limitada a la teca -- hasta unas horas después de ocurrir la ovulación.

Pero siguiendo con el estudio de la esteroidogénesis --

del folículo ovino digamos que la liberación de progesterona por los folículos intactos, tanto en controles como en los cultivados en presencia de FSH, representa una décima parte de la producida por el correspondiente fracción de la pared folicular, siendo debida esta acción con toda probabilidad a la mejor disponibilidad de nutrientes para las células granulosas junto a la ausencia de líquido folicular y su acción inhibitoria en la luteinización. Sin embargo, los niveles más altos de producción de progesterona se asociaron con cultivos colaterales de capas tecales y células granulosas sin que hasta el momento se haya encontrado explicación a este hallazgo.

Parece ser que existen unos mecanismos reguladores dentro del folículo ovino y así se ha encontrado que la síntesis inicial de AMP cíclico consiguiente a la estimulación de LH tiene lugar primeramente en la teca interna. La subsiguiente acción de este nucleótido sobre la membrana granulosa puede que sea una forma de regulación tecal de la función de la granulosa. De igual forma se ha demostrado que la testosterona y androstenodiona, secretadas por el compartimento tecal "in vitro", actúan directamente sobre la membrana granulosa iniciando la secreción de progesterona. Es interesante indicar la existencia de una interacción directa entre teca y granulosa, interacción que es precisa para la liberación sostenida de estrógenos.

Por lo dicho hasta ahora se puede afirmar que:

- i - Los estrógenos se secretan por los folículos intactos y por explantes de paredes foliculares. Ni las

capas teca<sup>les</sup> aisladas ni la membrana granulosa sola secretan estrógenos "in vitro"; sin embargo, las células granulosa<sup>s</sup> convierten la testosterona exógena en estrógenos en las primeras horas de la explantación. Existe una producción limitada y transitoria de estrógenos en los co-cultivos de teca y granulosa.

- ii - La testosterona se secreta, en presencia de FSH, en aproximadamente igual cantidad en el folículo intacto que en su pared o en las capas teca<sup>les</sup>. Las células granulosa<sup>s</sup> aisladas no secretan testosterona.
- iii - La progesterona es secretada por cada uno de los componentes celulares si bien las cifras más altas corresponden a las de células granulosa<sup>s</sup>.
- iv - Los andrógenos foliculares se sintetizan en la teca si bien se precisa una interacción entre teca y granulosa para la producción de estrógenos.
- v - Es muy importante que exista un contacto directo entre dos componentes celulares para la modulación de la función esteroideogénica dentro del folículo.

Según han demostrado BRAND y De JONG (1973) en todos los estadios del ciclo ovárico de la oveja es posible que ocurra la atresia de los folículos antrales, siendo en este sentido el trabajo de HAY y col. (1976) uno de los más profundos. Los hallazgos de



estos autores indican que en la atresia primaria las vacuolas que representan el retículo endoplásmico edematoso son prominentes a lo largo del borde antral junto con células granulosas desorganizadas que contienen núcleos picnóticos. Las células fagocíticas -- que se incrementan en número a medida que progresa la atresia, -- fueron vistas dentro de la membrana granulosa y se considera que son células granulosas transformadas. Las vacuolas antrales y los núcleos picnóticos pueden verse incluso en los folículos clasificados como no atrésicos.

Durante la atresia secundaria existe un gran aumento de las células con núcleos picnóticos; muchos de estos núcleos están extruidos y fusionados formando los característicos cuerpos atrésicos Feulgen-positivos, que se encuentran a lo largo del borde -- de la cavidad antral. Normalmente estos cuerpos presentan un diámetro de hasta 15  $\mu\text{m}$ , aunque ocasionalmente pueden llegar a medir hasta 400  $\mu\text{m}$ . En la membrana granulosa se encuentra una segunda -- área de degeneración que abarca a dos o tres capas celulares de -- la lámina basal siendo a este nivel donde ocurre la exfoliación -- de las células granulosas, características de la atresia terciaria. En contraste con la membrana granulosa, durante la atresia -- secundaria, solamente se observan ligeras indicaciones de degeneración en los cumulus.

En la atresia terciaria, la membrana granulosa se encuentra muy desorganizada, los cuerpos atrésicos son más numerosos que en los estadios anteriores. La lámina basal permanece esencialmente intacta, siendo en esta fase donde aparecen los primeros signos

de degeneración en la teca interna. Independientemente de que --- exista algo de degeneración de los cúmulos, se mantiene la integridad del oocito y su núcleo permanece vesicular.

Los cambios de la microcirculación tecal puede que jueguen un importante papel en el mecanismo de la atresia: adyacente a la lámina basal de los folículos no atrésicos, existe una red capilar bien desarrollada que se reduce notablemente a medida que progresa la atresia.

MOOR y col. (1977) corroboran en parte los anteriores trabajos y van aún más allá por cuanto miden, tanto "in vitro" como "in vivo", la función esteroidogénica de las diferentes clases de folículos durante la atresia, utilizan, a este respecto, un sistema del que afirman que es muy útil para clasificar con considerable exactitud, los folículos no atrésicos, de los intactos pero atrésicos.

El contenido total de esteroides (estrógenos no conjugados, testosterona y progesterona) en los grandes folículos no atrésicos fue considerablemente mayor que en los atrésicos de gran tamaño (115 pmol frente a 54 pmol, respectivamente) e incluso que los pequeños, tanto atrésicos como no (6 pmol). La diferencia de esteroides totales parece sea debida al contenido de esteroides del líquido folicular ya que en el propio tejido no se observan diferencias significativas. Además de estas diferencias de esteroides totales también es posible detectar diferencias en las proporciones relativas de los tres esteroides indicados. El esteroi-

de predominante en los grandes folículos no atrésicos son los estrógenos que llegan a representar aproximadamente el 80% del total; sin embargo, en los grandes folículos atrésicos y en los pequeños folículos el esteroide predominante es la testosterona. No obstante, las diferencias en los tejidos carecen de importancia: la concentración de estrógeno tisular en los dos tipos de folículos fue la misma, aun cuando el nivel de progesterona, aunque bajo, fue 2,5 veces mayor en el tejido del folículo atrésico que en el del no atrésico.

Por otro lado, se pudo comprobar que los grandes folículos no atrésicos secretaron más esteroides al medio de cultivo -- (1153 pmol/24 h) que los folículos atrésicos (730 pmol/24 h) del mismo modo en los pequeños folículos se observaron diferencias correlativas aunque con concentraciones más pequeñas. Pero teniendo en cuenta la cantidad de tejido implicado, ésta es relación entre secreción de esteroides y cantidad de tejido folicular las diferencias no son significativas entre las cuatro categorías de folículos (grandes folículos atrésicos y no atrésicos y pequeños folículos no atrésicos y atrésicos). Los grandes folículos no atrésicos difieren, como ya hemos dicho, marcadamente de los otros tres grupos de folículos en que secretan predominantemente estrógenos. Estos esteroides representan el 76% de la producción total, los andrógenos el 19% y la progesterona el 5%. Sin embargo, los grandes folículos atrésicos secretan más andrógenos (testosterona más androstenodiona), llegando a representar el 71% del total.

Los resultados de MOOR, HAY, DOTT y CRAN (1978) indican

que la testosterona y androstenodiona encontrada en el líquido folicular de los folículos atrésicos y no atrésicos de ovinos guarda una relación molar de 3:2. Relación ésta que es similar a la encontrada en los bóvidos pero muy distinta de la encontrada en los humanos, donde abunda más la androstenodiona.

En cultivos de tejidos los folículos ovinos secretan -- más testosterona que androstenodiona (SEAMARK, MOOR y McINTOSH, 1974 y SEAMARK, AMATO, HENDRICKSON y MOOR, 1976).

Según BAIRD y SCARAMUZZI (1977) parte de la androstenodiona puede ser secretada por el cuerpo luteo y el estroma, aunque en cantidades que en nada contarán para el mantenimiento de la relación antes dicha. Según ha demostrado MOOR (1977) y hemos comentado, la testosterona es el andrógeno que se aromatiza más fácilmente en el folículo ovino, por ello parece posible pensar que después de un ritmo de síntesis relativamente similar, la testosterona puede ser utilizada como sustrato para la producción de estrógenos, mientras que la mayor parte de la androstenodiona puede secretarse sin alteración a la circulación general.

Los folículos atrésicos, como ya hemos dicho, sintetizan pocas cantidades de estrógenos, lo que puede ser debido a los cambios celulares inducidos durante la atresia o, alternativamente, puede que sea una característica inherente de las células del folículo antral; también se ha postulado que la síntesis limitada de estrógenos sea un factor predisponente a la atresia. Independientemente de la razón o no de estas posibilidades, han quedado

establecidos dos factores de gran importancia en relación con la esteroidogénesis durante la atresia; el primero es la capacidad limitada de salida de estrógenos en los folículos atrésicos, no por falta de precursor androgénico, sino más bien por limitaciones del sistema enzimático aromatizante. En segundo lugar, que los estrógenos están íntimamente relacionados en el mantenimiento de la función normal de los folículos no atrésicos.

RICHARDS y col. (1978) indican que la iniciación de la secreción de estrógenos y la respuesta de las células granulosas a este esteroide son factores clave para determinar si un folículo ovula o se hace atrésico.

Para MILLER y col. (1977) durante las primeras 48-72 horas después de la aparición del estro (día 0) en la vena ovárica se encuentra poca o ninguna cantidad de estradiol y/o progesterona. Desde el día 3 hasta el día 14 la progesterona se secreta a partir del cuerpo luteo. La onda pro-estral de secreción de estradiol ocurre unas 36 horas antes de que se manifiesten síntomas de celo en el animal; sin embargo, en ese período se observa muy poca secreción de progesterona. Durante la fase lútea se observa otra subida de estradiol (días 3-4, 6-9, y 10-12).

Del magnífico trabajo de revisión de SMITH (1972) se deduce que el reciclaje de la progesterona en el ovario de la oveja es de solamente 10 minutos. Esto hace pensar que la gónada de la oveja no es precisamente considerada como órgano de almacenaje hormonal. Sin embargo, el ovario, al igual que otras glándulas se

cretoras de esteroides con poca capacidad de almacenaje hormonal pueden almacenar gran cantidad de precursores; en el caso que nos ocupa parece que sea el colesterol el que puede alcanzar una cifra tan importante como el 7% del peso total del ovario. Y ahora nos podríamos preguntar ¿en qué lugar de las células ováricas se encuentra el colesterol?.

Ya hablaremos de las gotitas lipídicas contenidas en el citoplasma de la teca (o de la granulosa), pues bien, parece evidente que esas gotitas lipídicas están formadas por colesterol, ya que cuando se estimula la glándula para secretar hormona el número de esas gotitas lipídicas decrece notablemente, acompañándose este descenso por una disminución paralela del contenido de co lesterol en el tejido.

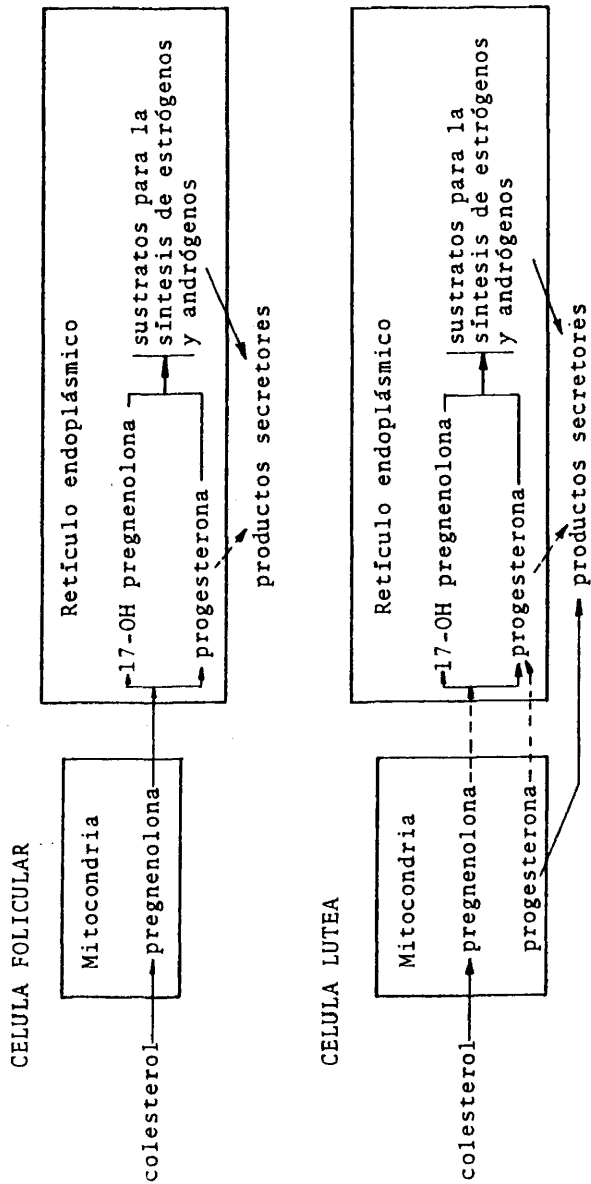
Por otro lado, el paso de precursor a hormona propiamente dicha parece estar catalizado por una enzima mitocondrial, lo que explica la estrecha unión que existe entre gotitas lipídicas y mitocondrias en algunas zonas celulares.

Los cambios cíclicos de la secreción de gonadotropinas hipofisarias ofrece una explicación inmediata a algunas, pero no a todas las diferencias en cuanto a amplitud y modelo de producción de esteroides por parte de los folículos activos obtenidos en distintas fases del ciclo. Es evidente que el ritmo de secreción basal de FSH en la oveja es relativamente alto, aún cuando todos los autores no coincidan en cuanto a niveles obtenidos; sin duda, la técnica utilizada en las determinaciones es un factor de

terminante. De cualquier forma, lo que está claro es la subida de concentración de esta gonadotropina en el momento de la ovulación o inmediatamente después, siendo los valores más bajos obtenidos precisamente antes y después de que la curva de concentración alcanza ese "pico" estral.

Los altos niveles de gonadotropina secretada en el estro ejercen un efecto dominante sobre el potencial esteroidogénico de los folículos. La secreción de estrógenos a partir de un gran folículo preovulatorio está determinada por los altos valores de LH, y el folículo luego se transforma en secretor de progesterona y  $20\alpha$ -di-hidro-pregn-4-en-3ona, HAY y col. (1975) indican a este respecto que muchos de los folículos más pequeños, a los que antes hacíamos referencia, se ven también influenciados por las gonadotropinas presentes en el estro; el resultado de esta estimulación se refleja por la alta liberación de andrógenos y  $17\alpha$ -hidro-progestina durante los primeros 2-4 días de presentarse el ciclo. Por el contrario, el aumento marcado en la secreción de estrógenos que se encuentra en los folículos al principio de la fase folicular no se ve precedida o acompañada de grandes cambios en la secreción de gonadotropinas.

Hemos mencionado anteriormente las mitocondrias, elementos que según algunos autores tienen papel decisivo en la síntesis de esteroides por parte del ovario. CHANNING y col. (1980) citando a DIMINO y col. (1979), resumen en el siguiente cuadro el papel hipotético de como la esteroidogénesis mitocondrial puede influir sobre los productos de secreción del tejido ovárico.



Posibles rutas:

— primaria

----- secundaria



Aún cuando la teca interna, como hemos dicho, es la --- fuente principal de la producción de estrógenos ováricos en la -- oveja, este tejido no sufre demasiados cambios a lo largo de la - mayor parte del ciclo estral. Está formada por células, semejan-- tes a fibroblastos, alargadas, interpuestas con unas cuantas célu las grandes de tipo epitelioides. Se encuentran también numerosas - fibrillas de colágeno. Sin embargo, el día 15 cuando alcanza su - más alto nivel la producción de estrógenos preovulatorios, la te- ca interna de los folículos mayores se vasculariza más, concomitan- temente aumenta el número y tamaño de las células epitelioides. Me diante microscopía electrónica se puede ver que estas células pre sentan muchas características ultraestructurales que son típicas de las células que secretan esteroides (CHRISTENSEN y GILLIN, 1969). Contienen moderadas cantidades de retículo endoplásmico liso y al- gunas partes de retículo endoplásmico rugoso, un aparato de Golgi bien desarrollado y mitocondrias elongadas, en algunas de éstas - las crestas son tubulares.

Algunas de las modificaciones aquí apuntadas ya habían sido consideradas en éste nuestro trabajo (vease apartado 3, tra- bajo de BJERSING y col., 1972). Sin embargo, como muy bien puede contrastarse los autores enfocan de distinta manera el tema. Aquí, en esta parte, nos ocupamos más del aspecto funcional que del mor- fológico, mientras que allí anotábamos las modificaciones estruc- turales a lo largo del ciclo. De cualquier forma, los resultados de todos los investigadores concurren en las líneas más generales aunque alguno de ellos fije más su atención en pequeños matices.

En contraste con muchas células secretoras de esteroides las de la teca de los folículos que secretan estrógenos contienen muy pocas gotitas lipídicas y virtualmente carecen de gránulos de membrana densa; el esparcimiento de estas inclusiones intracelulares puede que esté relacionado con su alto ritmo de intercambio - esteroideo sin prácticamente almacenaje de precursores o de esteroides propiamente dichos.

La teca externa contiene fibroblastos y células mioideas que recuerdan a las de la fibra del músculo liso, y puede que tengan una función contráctil (O'SHEA, 1973). No existe una estrecha unión entre la teca interna y la externa o entre esta última y el tejido estromal del ovario.

En contraste a la teca interna, la membrana granulosa - tiene organización ultraestructural bien definida; sin embargo, - la actividad funcional de la granulosa está menos clara que la de la teca. En el momento que el folículo preovulatorio se encuentra secretando estrógenos activamente, las células granulosas carecen de aporte sanguíneo y parecen encontrarse esteroidogénicamente -- inactivas, aunque sintetizan y secretan otras sustancias, tales como mucopolisacáridos y proteínas dentro del líquido folicular. Básicamente este fluido es un trasudado plasmático. La membrana - granulosa puede afectar a la composición del líquido folicular actuando como una verdadera barrera, evitando así que algunas sustancias, como proteínas de alto peso molecular, penetren al líquido folicular.

En el folículo de Graaf secretor de estrógenos, la membrana granulosa tiene la apariencia de un epitelio estratificado compuesto de 5-15 capas de células y separado de la teqa interna por una lámina basal fácilmente distinguible. Las células granulosas basales son columnares y están muy juntas mientras que aquellas más cercanas al antro son más redondas presentando lagunas de líquido folicular entre ellas. Por microscopía electrónica se puede apreciar que las células de la región basal presentan una posición compacta. Algunas protuberancias de las células granulosas parecen invaginarse dentro de las células vecinas, constituyéndose probablemente, una red celular compleja. El espacio intercelular tiene una anchura de unos 200 Å aunque se encuentra interrumpido por uniones complejas que conectan con las células adyacentes. Estos complejos presentan, por lo general, dos formas: 1) forma de pilar, un área especializada del plasmalema que a menudo se extiende sobre una distancia considerable y el área de unión puede incluir al plasmalema del cuerpo celular, o alternativamente de una protuberancia celular que se invagina dentro de otra célula granulosa; 2) forma anular en la que el complejo de unión parece encontrarse completamente separado del plasmalema de la célula. Algunos de los complejos anulares son, probablemente, secciones transversas de los procesos celulares en forma de dedo que -- han invadido a las células vecinas, mientras que otros pueden ser verdaderas inclusiones intracelulares derivadas de una protuberancia de invasión (MERK y col., 1973). En la membrana granulosa de folículos maduros se han observado, mediante microscopía electrónica, similares conexiones intercelulares, aunque a decir verdad

se ha prestado muy poca atención a la estructura o función de estas complejas uniones. HAY y MOOR (1975) han observado espacios vacíos en esas uniones de la membrana granulosa de los folículos de la oveja y otros autores piensan que la complejidad de unión de la que hablan otros investigadores en otras especies no sean más que eso, espacios de unión, que por otra parte, pueden ser medios de comunicación intercelular permitiendo a las células de la granulosa funcionar de forma unificada. La membrana granulosa ha sido considerada como un "sincitio funcional" a través del cual se pueden propagar estímulos químicos y hormonales y donde pueden ocurrir cambios metabólicos. Los espacios indicados puede que jueguen un papel importante en la influencia inhibitoria que tiene la membrana granulosa sobre la maduración del oocito.

Por lo que se refiere a las uniones más gruesas entre las células granulosas existe una controversia muy amplia, posiblemente porque no se disponga de una técnica precisa para identificarlas adecuadamente.

De cualquier forma ZAMBONI (1974) ha sugerido que estas uniones puede que intervengan en la constitución de esa barrera sangre-folículo a la que antes hemos aludido, postulando que esta barrera puede ser efectiva para el mantenimiento de un ambiente homeostático alrededor del oocito, al igual que existe en el macho en las células de Sertoli, necesario para el desarrollo de los espermatozoides; ahora bien la selectividad de estas barreras no son comparables, pues mientras en el macho no la atraviesa --- prácticamente ninguna proteína, la barrera folicular solo sirve -

para evitar la penetración de la sangre al líquido folicular y de proteínas de alto peso molecular, como ya hemos dicho anteriormente.

La fina estructura de las células granulosas está en -- consonancia con la creencia de que tienen una gran capacidad de -- síntesis. Estas células tienen un aparato de Golgi bien desarro-- llado y una moderada cantidad de retículo endoplásmico, aunque -- con pocos ribosomas unidos a las membranas. Pero eso sí, existen varios ribosomas y polirribosomas libres, característica ésta de células que proliferan rápidamente y de células que sintetizan -- proteínas pero que no las secretan. Las células granulosas carecen prácticamente de gránulos unidos a la membrana y muy pocos cuer-- pos densos. En lo que se refiere a las gotitas de lípidos, algu-- nas presentan unas pocas muy esparcidas, mientras otras contienen grandes cantidades de lípidos.

Una estructura no corriente pero que se ve con frecuen-- cia en las células granulosas de la oveja 48 horas antes de la -- ovulación son las inclusiones de glucógeno y retículo endoplásmi-- co liso; estas inclusiones se localizan a menudo en la parte basal de las células, junto a la lámina basal (HAY y MOOR, 1975). Su sig-- nificación no es conocida pero CORTEEL (1973) ha sugerido que pue-- den ser el origen de grandes cantidades de retículo endoplásmico - liso que por otra parte se desarrolla muy rápidamente cuando las - células granulosas se luteinizan en la ovulación.

O'SHEA y col. (1978a) encuentran que la teca interna de

los folículos con un diámetro de 2,0 a 2,9 mm, está formada por -  
unas 8-12 capas de células algo aplanadas, fácilmente demarcadas  
de la granulosa sobre su superficie más interna y emergiendo más  
gradualmente con la teca externa vecina. En las partes internas -  
se observan muchos capilares, mientras que en el borde más exter-  
no aparecen algunos vasos de mayor tamaño.

La lámina basal de la granulosa forma una banda conti--  
nua y uniforme, sin pliegues o convoluciones que se encuentra por  
debajo de la base de las células granulosas. Esta lámina queda se  
parada de las células tecaes por unas cuantas microfibrillas de  
colágeno.

Las células de la teca interna se encontraron elongadas  
y aplanadas en un plano circunferencial, dentro del cual aparecían  
en cualquier dirección. Se encuentran muy agrupadas, solo separa-  
das por estrechas bandas de colágeno, cuyas microfibrillas se cons-  
tituyen en pequeñas bandas orientadas en muchas direcciones, den-  
tro del plano circunferencial. En algunas partes se observó que -  
las células tecaes se encuentran unidas a sus vecinas bien lado-  
lado o extremo-extremo u oblicuamente, las membranas plasmáticas  
adyacentes se encuentran paralelas durante una considerable dis--  
tancia, separadas por estrechos espacios.

Si exceptuamos las células endoteliales, los pericitos  
y algunos leucocitos extravasados ocasionalmente, las células de  
la teca interna parecen constituir una población simple, si bien  
aparecen diferencias individuales y también variaciones entre las

procedentes de distintos folículos.

Los núcleos de todos los tipos son muy parecidos, forma óvalo elongada, presentando pocas irregularidades de contorno y - conteniendo uno o más nucleolos. La heterocromatina se encontró - uniformemente repartida, con alguna condensación en la envoltura nuclear.

Por el contrario, el citoplasma presentó mucha variabilidad. En un extremo contenía solamente unas cuantas mitocondrias y perfiles elongados o redondos de retículo endoplásmico (ER), -- junto con un número moderado de ribosomas. Otras células mostraron grandes cantidades de ER, algunas de éstas contenían cisternas ampliamente dilatadas; en otras células el ER se encontró en forma casi tubular.

En todos los tipos de células tecales internas se vieron complejos de Golgi asociados con pequeñas vesículas, vesículas sin recubrimiento observándose que las agregaciones mayores - de vesículas se vieron en las células ricas en ER tubular. En general, este tipo de células parecen contener más mitocondrias, -- con una mayor proporción de cristales tubulares, células similares a fibroblastos o estructuras intermedias. Sin embargo, las estructuras mitocondriales fueron relativamente uniformes, independientemente del tipo o grado de diferenciación, aunque tiene forma -- muy variada (redondas u ovales, elongadas o ramificadas) con densa matriz.

Las células de todos los tipos mostraron cuerpos ocasio

nales, redondos con diámetro aproximado a 1,0  $\mu$ m, que posiblemente son lisosomas. A veces se pudo observar en las células de los tipos tecaes, vesículas micropinocitóticas.

En las células con apariencia de fibroblastos se observó en el citoplasma la presencia de pequeños agregados de filamentos finos, dispuestos longitudinalmente. Pocas gotitas de lípidos.

El conteo diferencial de los tipos de células descritos fué prácticamente imposible.

Respecto a los capilares, que se concentraban en la región próxima a la lámina basal, parecen de tipo uniforme, constituidos por una capa simple de endotelio rodeado por una lámina basal de varias capas y una capa incompleta de pericitos. El lumen, por lo general se encontraba ocluido, excepto en los sitios donde había células sanguíneas. Las uniones intercelulares variaron de terminación simple a áreas de solapamiento o interdigitaciones entre los márgenes de las células vecinas.

En folículos mayores de los descritos, folículos entre 3,0-5,9 mm de diámetro, no se observaron diferencias con los hallazgos descritos anteriormente. Sin embargo, la proporción de células con citoplasmas ricos en ER tubular fue mayor (de 20 pasó a 40%) observándose también un aumento en el grado de variabilidad estructural entre los folículos, ya que algunos de éstos presentaron un aumento del número y grado de diferenciación citoplásmica de las células con ER tubular, siendo estos túbulos de forma estrecha con pocos ribosomas.



En los folículos mayores, aproximadamente el día 15 del ciclo estral se observan células de la teca interna menos planas que en los estadios anteriores y un pequeño aumento de la proporción (50%) de células con ER tubular.

En las primeras fases del estro, las células de la teca interna son más redondeadas presentándose en forma de racimo con núcleos redondos. Se reduce a 4-5 el número de capas con una definición más neta entre los bordes de la teca interna y la externa. La lámina basal de la granulosa permanece intacta.

En este estadio es notable la variabilidad estructural de las células, algunas de ellas permanecen con una estructura similar a los fibroblastos, mientras que en otras existe gran cantidad de retículo endoplásmico tubular con algunos ribosomas unidos a él, sin que la proporción de estas células se incremente. Se observó asimismo un alargamiento de las células de casi todos los tipos.

Se continuaron observando los contactos célula-célula ya descritos, aún cuando los espacios intercelulares estaban más alargados, con pérdida del agrupamiento de colágeno entre células vecinas. Las gotas lipídicas y los cuerpos semejantes a lisosomas fueron más numerosos. Los vasos sanguíneos en la teca interna se encontraron más distendidos que antes.

En los folículos de las últimas horas del estro aparece un edema de la teca interna con amplia dispersión de las células. Los pequeños vasos sanguíneos se presentaron más dilatados.

La variabilidad celular permaneció casi invariable, con ribosomas unidos a la membrana de las células con ER tubular al igual que en los primeros estadios del desarrollo folicular, pero los contornos de estas células son algo más largos que en esos es tadios iniciales mencionados, ésto da la impresión de un aumento de la proporción de células de estructura intermedia.

Las formas de las células tecaes fueron menos regulares que antes, presentando algunas prolongaciones lobuladas, semejantes a pseudópodos. Las gotitas lipídicas también aumentan.

En ocasiones se observaron roturas de la membrana basal que se pueden proyectar dentro de la membrana granulosa.

Los hechos más notables que se observaron en las primeras horas del período post-ovulatorio fueron la mayor abundancia de las discontinuidades de la lámina basal sin que sea difícil diferenciar ultraestructuralmente la membrana granulosa y la teca interna, las células de ésta no presentan cambios notables sin -- que se observara evidencia de muerte celular o degeneración. Las gotitas de lípidos permanecen en gran número. Se observó presen--cia de eosinófilos en la teca interna.

De todo este análisis estructural O'SHEA, CRAN, HAY y - MOOR (1978a) concluyen que:

- 1.- La teca interna de folículos de 2 a 2,9 mm de diámetro contienen muchas células cuya estructura es compatible con una capacidad esteroidogénica.
- 2.- Los cambios en las células tecaes diferenciadas --

hasta los primeros estadios del estro fueron más --  
cuantitativos que cualitativos, sugiriéndose así un  
incremento de la capacidad para sintetizar esteroi-  
des.

- 3.- La acumulación de lípidos en muchas células de la -  
teca interna a las 18 horas antes del estro refleja,  
con toda probabilidad, una disminución de capacidad  
de síntesis, y
- 4.- No existe evidencia de una especialización estructur  
al para facilitar el transporte de esteroides des-  
de la teca interna a la membrana granulosa.

### 3.4.- OOGENESIS

El ovario de los animales domésticos es de los pocos - ejemplos de órganos en los que el número de elementos activos es es tá fijo desde el nacimiento.

En la formación folicular existe un doble gradiente co mo consecuencia del desarrollo ovárico, algunos folículos se for man más tempranamente que otros.

El número de folículos utilizables a lo largo de la vi da de la oveja depende de la fuerza de los procesos oogénico y - meiótico.

El crecimiento de un folículo a partir del estadio pri mordial o del preovulatorio es el resultado de tres procesos: 1) crecimiento de los oocitos, 2) organización y multiplicación de las células foliculares, y 3) formación del antro.

El proceso de crecimiento folicular una vez comenzado continua sin interrupción hasta la ovulación.

El crecimiento del oocito queda reducido cuando el fo- lículo llega a cierto tamaño, durante este crecimiento aumenta - la síntesis de RNA nucleolar alcanzando un máximo según el tama- ño del folículo para luego decrecer a medida que se forma el an- tro.

El folículo también aumenta de tamaño a causa de la mul tiplicación y disposición celular alrededor del oocito. Poco se -

conoce acerca de la predeterminación y organización de las multiplicaciones celulares alrededor del oocito aunque se puede suponer que su falta de funcionalidad puede provocar una atresia por distorsión del folículo (MARIANA, 1980).

El antro aparece de una manera difusa entre las células de la granulosa, luego estos espacios se conectan entre si en un único antro.

El crecimiento folicular, por otra parte, puede ser considerado como una lucha permanente para la supervivencia, un equilibrio dinámico entre la multiplicación celular y el proceso degenerativo.

El proceso de atresia, según HAY y col.(1979), puede - ser un fenómeno reversible bajo ciertas condiciones: cuatro días después de la administración de PMSG, por ejemplo, algunos folículos presentan distorsiones granulosas. La desaparición de folículos por atresia puede ser definido en el animal adulto como un proceso de vejez. La probabilidad de rotura folicular aumenta -- con la edad, definida a partir del momento en que el oocito está rodeado por células foliculáres.

Durante su desarrollo que afecta a varios ciclos, el - folículo no está sometido a un ambiente gonadotrópico constante, pero recibirá una estimulación periódica a partir del "cocktail" hormonal gonadotrópico, que puede modificar la actividad de las células granulosas. Se puede imaginar al ovario como una estación provista de una o varias subunidades estratégicas comparables a

las utilizadas en el diseño de sistemas electrónicos complejos.

Cada folículo con un antro es una unidad potencial, ca paz de ovular con un ambiente hormonal apropiado; si llega a hacerse atrésico, tal folículo queda reemplazado por otro que presente un estado de crecimiento y maduración similares. Este sistema se ha calificado como redundante, siendo los dos ovarios un claro ejemplo de sistema redundante ya que un solo ovario puede ser capaz de mantener la ciclicidad, ovulación y gravidez.

Existen dos métodos para estimar la duración del creci miento folicular (MARIANA, 1980) basados en dos modelos distintos: i) el modelo de ciclo celular, y ii) el modelo de compartimento es tocástico.

El fundamento del primero está basado en la estimación - del tiempo de duplicación de las células granulosas de los folícu los en crecimiento; a partir de este valor, el tiempo que transcu rre para una determinada clase folicular puede deducirse aplican- do la fórmula que da el número de conceptos que intervienen en el crecimiento exponencial.

De los resultados obtenidos por diferentes autores en - distintas especies, fundamentalmente en animales pequeños de labo ratorio, por lo que no los citamos, se puede concluir diciendo -- que las características del ciclo de las células granulosas varía durante el crecimiento folicular y que el tiempo de duplicación - de la población de células foliculares decrece cuando aumenta el número total de células.

El modelo de compartimento estocástico está basado en un modelo dinámico de población, constituida por los folículos de distinto tamaño a los que se clasifica en categorías de tamaño. Todos los folículos presentes en una determinada clase de tamaño, la pueden abandonar bien por atresia o porque pasen a la otra categoría de tamaño después de un tiempo de permanencia, que tiene cierta distribución. En la mayoría de los modelos, la duración de la permanencia de una clase dada sigue una distribución de probabilidad exponencial, cuyos parámetros varían de acuerdo a la clase de folículo considerado y la edad de la hembra.

A menudo se utiliza la ley exponencial para describir la duración de la vida para sistemas inestables; sin embargo, es una ley disimétrica pues se piensa que el crecimiento o degeneración de un folículo es independiente de las mismas características en los otros folículos (MARIANA, 1980).

A partir de los datos analíticos parece que durante la pubertad la cantidad de folículos está establecida para el resto de la vida y que los folículos con una capa de células rodeantes son esenciales para permitir la renovación de los folículos en crecimiento.

En los ovarios de las distintas especies domésticas se encuentran folículos de varios tamaños, formados por el oocito y una serie de células que lo rodean. Estas últimas de naturaleza epiteloidal y, consecuentemente, tan pronto se asocian al oocito forman un folículo primordial, una lámina basal aísla a esta nue-

va estructura del tejido conjuntivo circundante y del lecho vascular. En el estadio de folículo secundario no parece existir una - diferenciación morfológica entre las células foliculares, el oocito está uniformemente rodeado por células poligonales agrupadas. - Al formarse el antro se pueden distinguir dos poblaciones distintas de células foliculares: células que limitan la pared antral y que se consideran como granulosa mural o membrana granulosa y el - cúmulo u ooforo o capa celular más estrechamente relacionada con el oocito. La corona radiada es la capa celular que está en contacto inmediato con la zona pelúcida.

Dado que el folículo de los mamíferos está aislado de su entorno por una lámina basal y como quiera que es una estructura avascular, cada una de las células se nutre por difusión de las - sustancias que precisa como oxígeno, nutrientes, hormonas y otros materiales a partir de los capilares vecinos.

Tan pronto se forman los folículos se establece un contacto entre las células foliculares y el oocito y entre las propias células del folículo, no obstante la presencia de pequeños - espacios vacíos entre esas células y el oocito no es obstáculo para que exista un acoplamiento eléctrico y haya una colaboración - metabólica con intercambio de moléculas con el oocito (SZOLLOSI, 1980). Durante la vida adulta solamente crecen de forma regular - unos cuantos oocitos en los sucesivos ciclos estrales y no se tiene una idea muy clara, a pesar de la experimentación realizada al respecto, de como los nutrientes pasan desde la circulación al oocito.



Para la deposición normal de la zona pelúcida es muy importante que exista una estrecha relación entre los cúmulos celulares y el oocito, desarrollándose normalmente siempre que el oocito permanezca rodeado de las células foliculares; la formación de esta zona pelúcida es directamente dependiente de la presencia de FSH en la circulación, sin ella la zona solo se forma parcialmente o no llega a formarse. Recuerdese que los receptores de la FSH están ya presentes en la membrana de células granulosa cuando los folículos antrales comienzan a crecer rápidamente.

Es necesaria una interacción activa entre células foliculares y oocito para el desarrollo del factor de inhibición de la maduración meiótica. La inhibición del oocito depende aparentemente de su "contacto" con las células granulosas. No obstante la presencia de este factor de inhibición no ha sido aislado en todas las especies y de acuerdo con SZOLLOSI (1980) se precisa de unas investigaciones más completas.

Las íntimas relaciones entre corona y oocito son evidentes en dos aspectos de la maduración citoplásmica del oocito. El papel positivo de esta relación está centrado en el desarrollo del factor del crecimiento del pronúcleo del macho, mientras que la parte negativa está adscrita a la "maduración cortical". Si experimentalmente se extraen folículos antrales realizando "in vitro" la maduración meiótica, la penetración espermática si tiene lugar, pero la cromatina de la cabeza del espermatozoide no se hincha para constituir el pronúcleo masculino, por tanto, se inhibe el desarrollo embrionario. Sin embargo, cuando se extrae el --

complejo cúmulo-oocito después de unas horas de haber inyectado - HCG o LH y se cultivan hasta la obtención de la maduración mei*ó*ti-  
ca, *¶*í que se desarrolla el pronúcleo masculino y la fertiliza-  
ción progresa normalmente. Es importante pues anotar que la ferti-  
lización monospermica normal debe depender de la asilación del --  
oocito de las células vecinas después de la descarga de las hormo-  
nas de la ovulación.

Recientemente se ha demostrado la mucificación y sínte-  
sis de ácido hialurónico en los cúmulos celulares unas horas an--  
tes de la ovulación y por los resultados obtenidos "in vitro" se  
sabe que esa mucificación es dependiente de la FSH ya que las cé-  
lulas no responden con la misma eficacia a la LH. Por otra parte,  
las células granulosas murales no responden similarmente a las go-  
nadotropinas al mismo tiempo, no obstante, de momento no se sabe  
el papel funcional de esa mucificación, aunque se sospecha, pero  
no está confirmado, que la mucificación tenga un papel importante  
para obtener un transporte más eficaz del oocito a lo largo del -  
oviducto (SZOLLOSI, 1980).

Durante la maduración de los oocitos existen una serie  
de cambios cualitativos por lo que a la síntesis de proteínas se  
refiere, si bien estos cambios son compatibles con la fertiliza-  
ción normal y subsiguiente desarrollo embrionario (MOOR y TROUNSON,  
1977).

En los oocitos madurados "in vitro" se aprecia una acti-  
vación nuclear espontánea y una síntesis proteica que sin duda --

puede reflejar los cambios fisiológicos normales de la actividad sintética del oocito.

Los mayores cambios en el módulo de síntesis proteica - ocurren inmediatamente antes de la rotura de la vesícula germinal. En la oveja ocurren más particularmente, según WARNES y col. (1977) unas 9 horas después de la liberación masiva de LH.

El modelo de producción proteica por parte del oocito - cultivado dentro del folículo se corresponde con aquel observado "in vivo"; los cambios de la síntesis proteica se inician alrededor de 9 horas después de adicionar gonadotropina, completándose a las 15 horas. Sin embargo, los oocitos cultivados fuera del folículo, en un medio conteniendo gonadotropina no mostraron cambios en lo que a síntesis proteica se refiere, de tal forma que a las 15 horas solo las proteínas producidas en los estadios iniciales de maduración eran las que estaban presentes.

Sin embargo, MILLER y col. (1977) dicen que la capacidad de síntesis proteica por parte del oviducto y endometrio es variable a lo largo del ciclo estral, de tal forma que el día 0 del ciclo el oviducto presenta un ritmo más alto de síntesis pero luego los días 2-5-10 y 14 los valores de ritmo de síntesis son más altos para el endometrio.

El papel de los esteroides en la maduración de los oocitos en la oveja ha sido objeto de una gran cantidad de trabajos. Por un lado, se ha postulado que los esteroides no intervienen en la maduración meiótica ya que la LH inicia la meiosis en los foli

culos aún cuando exista una supresión total de esteroidogénesis - folicular (LINDNER y col., 1974 y LIEBERMAN y col., 1976). Por otro lado, y en vista de los hallazgos de varios autores, citados por MOOR (1978), los esteroides han sido considerados como indispensables, junto a las gonadotropinas, en la inducción de la maduración citoplasmática de los oocitos de oveja.

Parece oportuno señalar, a la luz de investigaciones recientes que durante la maduración de oocitos de los mamíferos existen dos fases claramente diferenciadas: i) una fase inductiva de unas 6-8 horas de duración que es folículo dependiente, y ii) una fase sintética que no depende del folículo. Con el fin de aclarar estas premisas MOOR (1978) ha realizado un trabajo "in vitro" llegando a las siguientes conclusiones: parece existir un período inductivo de 6-8 horas dentro del folículo, después del tratamiento con gonadotropinas, para que se complete la maduración de los oocitos en la oveja. La función esteroidea, durante esa fase inductiva, se caracteriza por: 1º - altos niveles de estrógenos, 2º - niveles intermedios de andrógenos, y 3º - niveles, relativamente bajos, de progesterona.

Por otro lado parece que no se precisa del soporte esteroideo para que se produzca la rotura de la vesícula germinal y la formación de la primera metafase, aunque se sugiera una intervención de los esteroides en los siguientes estadios de la maduración meiótica. Por otra parte sí se precisa un nivel sustancial de estrógenos para la maduración citoplásmica. Un nivel inadecuado de esteroides durante la maduración puede dar por resultado --

anomalías de fertilización, retraso en la implantación y un fallo casi total para que se produzca la diferenciación y formación blastocística.

A pesar de lo señalado, MOOR (1978) indica que es un tanto difícil definir la significación exacta de los estrógenos exógenos en la total maduración de los oocitos por cuanto en los cultivos "in vitro" la concentración endógena de estrógenos en los folículos cultivados es muchas veces mayor que la observada en el folículo preovulatorio "in vivo", por ello parece evidente el afirmar que los niveles de estrógenos en el líquido folicular no es un reflejo seguro de los niveles funcionales utilizados por el oocito. Alternativamente, es posible que los altos niveles de estrógenos sean críticos durante los primeros estadios de maduración. MOOR y col. (1975) señalan un incremento hacia el día 14 alcanzándose un nivel máximo 20-30 horas antes de la aparición del estro declinando rápidamente antes de la ovulación.

SCARAMUZZI y col. (1970) encuentran también un incremento a partir del día 14 con máximos de nivel los días 3-8. Estos resultados están de acuerdo con los encontrados por COX y col. (1971).

TERQUI y col. (1973) indican que el 17 $\beta$  estradiol se eleva 3 días antes del estro teniendo un valor máximo en el momento del mismo si bien los valores máximos varían de un ciclo a otro en el mismo animal, existen también variaciones entre animales y se observa asimismo una elevación en los días 2-4 del ciclo o entre el 7-9.

Por su parte MATTNER, y col. (1971) indican un pico de secreción de estradiol en los días 3-4 del ciclo, e indican la aparición de dos picos adicionales de secreción de estradiol entre los días 6-9, 11-15 e indican que la secreción de este estradiol no siempre procede del mismo ovario ni que necesariamente esté relacionado con el ovario que contenga cuerpo luteo o con aquel que vaya a ovular próximamente. Parece deducirse que las cantidades relativamente grandes de  $17\beta$  estradiol pueden secretarse de los ovarios durante tres períodos separados durante la fase lútea del ciclo. Así como también que dicho estradiol se puede originar a partir de folículos distintos a los que ocurra la ovulación.

Las hormonas gonadotrópicas pueden actuar sobre el crecimiento folicular y la estructura de la población folicular a -- cuatro niveles:

- a) modificando la multiplicación celular.
- b) modificando el crecimiento del oocito.
- c) desarrollando el antro.
- d) colaborando en la salida del complejo de folículos - primordiales.

El ovario de los animales prepuberales, muy jóvenes ha sido considerado durante mucho tiempo como incapaz de responder a las inyecciones de gonadotropinas exógenas, no obstante la observación de este fenómeno biológico depende de la escala de tiempo que se considere, del tipo de tratamiento y de la especie animal.

Durante los primeros estadios de vida, cuando el ovario construye su reserva folicular, es posible que la PMSG actúe sobre

la multiplicación y la organización de las células de la rete --  
ovarrii y, consecuentemente, sobre el número de folículos.

El oocito participa en el desarrollo folicular y, después de la administración de PMSG, se observa un incremento de la actividad RNA polimerasa, lo que revela un estado de diferenciación e iniciación de la maduración nucleolar preovulatoria.

Por otra parte se ha podido comprobar que las hormonas actúan a nivel de la formación del antro de dos formas: el antro aparece más temprano durante el crecimiento del folículo ó el antro está más desarrollado para una determinada clase de folículos en los animales que reciben la hormona que en los testigos.

Aumentando las dosis de FSH o de PMSG se produce un aumento del número de folículos antrales ¿Corresponde este aumento a una progresiva movilización de folículos o a una diferenciación del ciclo celular de una proporción aumentada de células, o a ambos?. Por el momento esta pregunta queda sin poderla aclarar de forma concluyente.

### 3.5.- OVULACION

En la oveja, el ritmo de ovulación está relacionado con el número de folículos, razas con alto ritmo de ovulación tienen significativamente menores folículos primordiales, pero más folículos en crecimiento, que las razas con menores ritmos de ovulación (MOOR y col., 1980).

El papel de las gonadotropinas en la incitación del crecimiento folicular es polémico, es muy probable que estas hormonas glucoproteicas actúen no como iniciadores obligatorios sino más bien como facilitadores del crecimiento folicular.

Una vez iniciado, el crecimiento es lento y los folículos preantrales tardan unos 4,3 meses en pasar al estado de desarrollo, siendo la FSH la gonadotropina más directamente responsable de ese crecimiento por cuanto que se une aún a los más pequeños folículos preantrales. La LH y la prolactina pueden también intervenir en este estadio de formación pero los resultados que hasta la fecha se tienen son inconcluyentes.

El ritmo de crecimiento folicular aumenta notablemente una vez que el folículo emerge del estadio preantral y se desarrolla un antro. La mayoría de los folículos antrales se hacen atrésicos y la proporción de folículos atrésicos en cada categoría de tamaño se incrementa al aumentar el tamaño del folículo. En la oveja el tiempo medio para que el folículo que está destinado a ovular pase por fase antral de desarrollo es de 34-43 días (MOOR y col., 1980).





La diferenciación celular y, en particular, los cambios en la actividad de recepción hormonal son aspectos críticos del desarrollo de grandes folículos antrales. Está muy claro que la FSH induce a la formación del antro, la FSH actuando sinérgicamente con estrógenos induce un rápido crecimiento postantral y finalmente estas dos hormonas inician el desarrollo de receptores a la LH en la membrana granulosa. Las alteraciones de este orden secuencial citado parece que sea la causa más fundamental de la aparición de la atresia. No obstante, existen otros puntos de vista -- acerca de los diversos factores intrafoliculares y hormonales que pueden inducir a la atresia (HAY, MOOR, DOTT y CRAN, 1979).

Y ya que hemos hablado de la FSH digamos que a esta gonadotropina se la ha prestado muchísima menor atención que a la LH, incluso existe una controversia manifiesta en lo que a las concentraciones de FSH se refiere, así BJERSING y col. (1972) señalan no encontrar modificaciones de concentración en los distintos estadios del ciclo (6, 15, 18 y 30 horas y 13-15 días) con valores medios aproximados a los 15 ng/ml. Mientras que KARSCH (1980) presenta unas concentraciones de FSH que superan los 250 ng/ml justamente el día 0 del ciclo, siendo éste el punto máximo aún cuando 4 días antes del estro las concentraciones de FSH superan los 50 ng/ml.

En cualquier momento el tamaño de cada clase de folículos en crecimiento depende del número total de folículos que crezcan, puesto que los ritmos de crecimiento folicular están en consonancia con las leyes de dinámica de fluidos. Existe una correla

ción negativa considerable entre el número de folículos de una clase y el ritmo de crecimiento de esa clase de folículos (vease MOOR y col., 1980). Sin embargo, las ecuaciones de regresión difieren - significativamente entre distintas ovejas y se demuestra eso sí - que cuando el número de folículos de una clase aumenta, decrece - el ritmo de crecimiento. Si esta correlación es casual impone se-rias restricciones al potencial de estímulo ovárico. Por ello, si el número de folículos de una clase determinada aumenta por hormonas, el estímulo exogeno puede producir también una respuesta compensatoria opuesta en el crecimiento folicular para facilitar al ovario su regresión al estadio normal. Estas limitaciones poten--ciales al estímulo ovárico posiblemente se puedan ver afectadas - al alterar el método o el tiempo de administración hormonal.

En el tejido ovárico que rodea al folículo y en este mismo, ocurren una serie de cambios estructurales dignos de mencionar, en las 72 horas que preceden a la ovulación en la oveja y que es-tán magistralmente estudiados por MOOR y col. (1975).

Sabido es que el CL regresa de forma rápida 48-72 horas antes de la ovulación y que en este estadio los ovarios de la oveja contienen uno o dos grandes folículos activos (de 4-5 mm de --diámetro). La teca interna de estos folículos, como ya hemos di--cho, contiene bastantes células semejantes a fibroblastos, inter-puestas con células epitelioides grandes que tienen una ultraestructura caracterfstica típica de células secretoras de esteroides. - La membrana granulosa se compone de 5-15 capas de células interdigitales estrechamente apuestas, encontrándose entre ellas numero-

sos complejos intercelulares de unión; el epitelio, por su parte, descansa sobre una lámina basal característica.

Unas 12 horas antes de la ovulación los cambios degenerativos se hacen aparentes en las células tecales, siendo lo más notable el acúmulo de numerosas gotitas de lípidos en las células epitelioides; algunas células se presentan contraídas y densas. La membrana granulosa también sufre cambios en el período preovulatorio; las células pierden su disposición compacta, se rompe el complejo sistema de uniones, algunas células degeneran y la lámina basal se rompe. Algunas protuberancias presentan microvellosidades y se proyectan desde las células granulosas a los grandes espacios intercelulares.

Durante las 72 horas que preceden a la ovulación la actividad de la  $3\beta$ -HSD ( $\Delta^5$ - $3\beta$  hidroxiesteroide deshidrogenasa) solo se puede poner de manifiesto histoquímicamente en los grandes folículos activados. La actividad de la enzima queda circunscrita a la teca interna donde la intensidad de la reacción aumenta al aproximarse la ovulación.

Unas 36 horas antes de la ovulación se aprecia una involución del CL y la consecuente terminación de la secreción de progesterona. Por el contrario, la liberación de estrógenos, a partir del ovario que contiene los mayores folículos aumenta gradualmente y alcanza un máximo de secreción (350 ng/h) 40-48 horas antes de la ovulación. Este incremento de secreción estrogénica, -- fundamentalmente de  $17\beta$  estradiol, permanece así durante aproxima

damente 20 horas y luego desciende vertiginosamente.

El tejido luteo obtenido de ovejas 24 horas después de la ovulación y mantenido en cultivo durante una semana, mantiene buena integridad estructural y produce altos niveles de pregnenolona, progesterona y  $20\alpha$ -hidroxipreg-4-en-3-ona en el medio de -- cultivo. Ni el tejido luteo de la oveja, ni las monocapas de las células granulosas son capaces de producir cantidades detectables de progestina  $17\beta$ -hidroxilasa, andrógenos o estrógenos "in vitro". El estroma ovárico de la oveja contiene pocos elementos secretorios y aunque se mantenga bien en cultivos, secreta poca cantidad de esteroides. Por el contrario, los grandes folículos activados producen altos niveles de estrógenos y andrógenos en los cultivos. El modelo de producción de esteroides por los folículos "in vitro" varía según el estadio del ciclo en que se encuentren en el momento de la extracción.

Los folículos procedentes de ovejas, 72 ó 48 horas antes de la ovulación producen esteroides a un ritmo medio de unos 80 ng/mg de tejido folicular en 24 horas, al séptimo día de su cultivo. Sin embargo, los folículos extraídos 12-18 horas antes de la ovulación producen unos 550 ng/esteroide/mg en 24 horas. Este notable incremento que se observa en los folículos que han recibido el estímulo de la liberación endógena de la gonadotropina es una evidencia de los cambios que se originan tanto cuanto al tipo de esteroides producidos como al tipo de células responsables de la síntesis de esteroides (SEAMARK y col., 1974).

Los grandes folículos activados obtenidos 72 horas antes de la ovulación y luego cultivados, son capaces de secretar - altos niveles de estrógenos (75 ng/mg en 24 h.) y algunos andrógenos, fundamentalmente en forma de testosterona. La producción de estrógenos se reduce en los folículos extraídos 36 horas antes de la ovulación si bien la reducción de producción de esteroides  $C_{18}$  queda reemplazada por un aumento en la producción de esteroides -  $C_{19}$  y  $C_{21}$   $17\alpha$ -hidroxilados. Es probable que las células de la teca interna sean las principales responsables de la síntesis de los esteroides indicados.

Los folículos obtenidos 12-18 horas antes de la ovulación, o lo que es lo mismo después de la liberación gonadotrópica, secretan pocos estrógenos y/o andrógenos y una pequeña cantidad - de progestina  $17\alpha$ -hidroxilada. La suspensión virtual de producción de "esteroides tecales" se ve acompañada por la producción de grandes cantidades de progesterona (300 ng/mg en 24 horas) y  $20\alpha$ -hidroxipreg-4-en-3 ona) (250 ng/mg en 24 horas) por parte de las células granulosas.

Ya hemos dicho que la secreción de estrógenos, por parte del folículo, antes del estro, induce a la liberación de una gran cantidad de LH hipofisaria 20-24 horas después. MOOR y col. (1975) indican que los altos niveles de LH actúan asimismo sobre el folículo preovulatorio, inhibiendo la producción de esteroides por parte de la teca interna y subsecuentemente, inician la luteinización y producción de progesterona por parte de la membrana -- granulosa. La infusión de 1 ng de LH en la oveja, 48 horas antes

de la ovulación, inhibe totalmente la elevación de producción de estrógenos que, normalmente, ocurre en las 24 horas siguientes. - De igual forma, la secreción de estrógenos por parte del folículo mayor que se mantiene en cultivos de tejidos se ve inhibida por - la previa infusión de LH "in vivo" o su administración "in vitro". Las gráficas adjuntas extraídas de un trabajo de MOOR y col. (1973) son altamente demostrativas de cuanto venimos diciendo (figura 7).

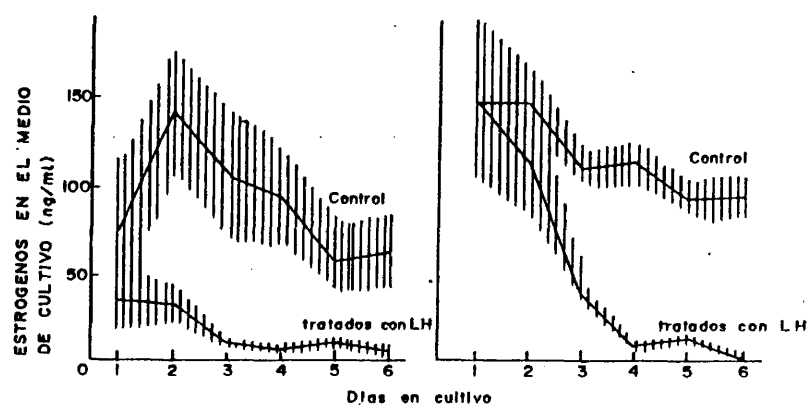


Fig. 7

En la gráfica A se incluye la producción media de estrógenos a partir de folículos ováricos extraídos 48 horas antes de la ovulación, mantenidos "in vitro". Los tratados con LH fueron - infundidos con 1 mg de esta hormona a las 6 horas de la ovariectomía, los controles fueron infundidos con solución salina. En la - gráfica B se encuentran las concentraciones de estrógenos en folículos extraídos 72 horas antes de la ovulación y mantenidos "in vitro" con 1 ng/ml de medio de LH.

La caída de la producción de estrógenos refleja una pérdida progresiva de la capacidad de síntesis de las células de la teca interna que se ve acompañada por cambios degenerativos de -- las células tecales que son visibles tanto a la microscopía óptica como a la electrónica. En efecto, el citoplasma de las células tecales se vacuoliza presentando muchas vacuolas y cuerpos residuales.

Simultáneamente a este descenso estrogénico se observa una elevación de la concentración de progesterona y su derivado -- 20 $\alpha$ -dehidro, un luteinizante morfológico de las células granulosas. Inicialmente las células se separan y la lámina basal descien de, de forma similar a lo que ocurre "in vivo" 6-12 horas después del "pico" de secreción de LH endógena. A los 2-3 días siguientes y cultivadas "in vitro" estas células presentan una disposición -- más compacta y adquieren muchas de las características ultraestructurales de las incipientes células luteínicas. Estos cambios se -- ven en los cultivos controles que no tienen gonadotropina, la teca permanece esteroideogénicamente activa durante todo el período de -- cultivo, permaneciendo prácticamente inactivas las células granulosas.

Según han demostrado varios autores, entre otros ROBINSON y col. (1971), el AMP cíclico juega un papel importante como mediador, sobre la acción de las gonadotropinas sobre el ovario -- de la oveja. En efecto, la adición de LH a los cultivos tisulares incrementa notablemente los niveles de AMP cíclico alcanzándose -- las cotas más altas a los 60 minutos de la adición. Analizando --

por separado los elementos tecales y granulosa, se ha establecido que la producción de este nucleótido queda restringida casi exclusivamente a las células de la teca interna como ha quedado señalado en el apartado de esteroidogénesis. Las células de la membrana granulosa son, aparentemente, incapaces de sintetizar grandes cantidades de AMP cíclico, de tal forma que las cantidades de nucleótido que se encuentran asociadas con la capa granulosa, que siguen a la estimulación de LH de los folículos enteros, parecen proceder casi en su totalidad de las células tecales. La respuesta del folículo al AMP cíclico, difiere según la cantidad de nucleótido adicionada. Cuando los folículos maduros se exponen "in vitro" a bajos niveles de dibutiril AMP cíclico (0,1 mM), la producción de estrógenos declina rápidamente y queda reemplazada primero por testosterona y luego por pregnenolona y  $17\alpha$ -dehidropregnenolona. Posteriormente casi la totalidad de producción de estrógenos parte del folículo cesa aún cuando el AMP se inyecte dentro del folículo. Cuando se adicionan bajos niveles de AMP a los cultivos de células granulosa aisladas, se estimula la producción de progesterona, de tal forma que ese ritmo supera significativamente al obtenido por la adición de LH a los cultivos.

La disminución de producción de esteroides por parte de la teca y la aparente inactividad de la granulosa al adicionar bajos niveles de AMP queda claramente demostrada al estudiar los cambios ultraestructurales. A las 24 horas se observa un acúmulo de gotas lipídicas en las grandes células tecales y 48 horas después los fibroblastos y células epiteloides contienen grandes cuerpos -



residuales y áreas con degradación focal. Por otra parte, la membrana granulosa, parece no afectarse mucho, desde el punto de vista morfológico, al adicionar AMP.

Parece probable que el AMP cíclico formado por las células de la teca en respuesta a la LH actúa sobre las de la granulosa como un "activador de difusión". El AMP cíclico está considerado como un mediador intracelular de la acción hormonal. Sin embargo, la liberación de AMP cíclico en el compartimento extracelular parece una evidencia a tener en cuenta en esta clase de tejidos - pudiendo considerarse como que desempeña un papel de activador a distancia.

Por otro lado y analizando las relaciones que puedan encontrarse entre la LH y las prostaglandinas, en los folículos, se ha postulado que estas últimas, especialmente aquellas de la serie E, intervienen en la mediación entre la LH y el sistema adenil-ciclasa, de tal forma que si se adicionan a los cultivos de tejidos con folículos, sustancias que bloqueen la síntesis de prostaglandinas, se altera la respuesta folicular a la subsiguiente estimulación de la gonadotropina. Por otro lado, se ha demostrado que la  $\text{PGF}_2$  y  $\text{PGE}_2$  estimulan la producción de progesterona por parte del folículo cultivado "in vitro"; sin embargo el modelo de producción de esteroides tras la estimulación por prostaglandinas, difiere significativamente del observado después de adicionar LH, HCG o AMP cíclico. De acuerdo con los resultados de MOOR, HAY y SEAMARK (1975) parece ser que las prostaglandinas son mediadores intrafoliculares obligatorios de la LH.

Resumiendo cuanto veníamos considerando respecto a la - regulación esteroideogénica y cambios estructurales en los folículos mayores y tejidos adyacentes antes de la ovulación, diremos - que la transformación que sufre el folículo preovulatorio de un - órgano secretor de estrógenos a órgano secretor de progesterona - es dependiente de la liberación de gonadotropina hipofisaria en - el momento del estro. Sin embargo, dentro del folículo se observan cambios notables antes de la liberación de la gonadotropina; el - folículo desarrolla una competencia esteroideogénica, se hace predominantemente fuente de síntesis de estrógenos y adquiere la facultad de responder a la LH, posiblemente por el desarrollo selectivo de su capacidad receptora.

Posiblemente son varios los lugares donde ejerce su acción la LH en el folículo. Los cambios intraováricos en la microcirculación, la relativa permeabilidad de los capilares foliculares y el nivel de metabolismo celular son factores que están bajo regulación hormonal. La LH influye sobre la disponibilidad y distribución de los precursores esteroideos, promueve la formación de AMP cíclico en la teca interna e inicia la luteinización de -- las células granulosas y la producción de progesterona. De otra parte, la LH destruye la integridad estructural y funcional de la teca interna; el sistema aromático responsable de la aromatización queda inhibido (sobre esta acción no hemos insistido por cuanto - es un tema que queda un tanto al margen de nuestros propósitos), - disminuye la producción de esteroides y aparece una degeneración celular.

LAND (1980) hace una exhaustiva revisión de los múltiples factores que pueden influir en el ritmo de la ovulación de la oveja y de lo dicho por otros autores concluye que efectivamente la población de oocitos es muy variable de unas razas a otras, existiendo una relación negativa entre población de oocitos primarios y el subsiguiente ritmo de ovulación.

Sin embargo, el número de folículos grandes está relacionado positivamente con el ritmo de ovulación. Por otro lado parece que la diferencia de ritmo se desarrolla en el estadio primordial, siendo reclutados más folículos durante la fase transicional dependiente de la gonadotropina en las ovejas con alta prolificidad.

La atresia parece ser igual en las razas que tienen alto y bajo ritmo de ovulación.

Las diferencias apuntadas pueden depender también de diferencias endocrinas. En definitiva parece estar claro que existe una asociación positiva entre el número de huevos y el intervalo entre la aparición del estro y la descarga preovulatoria de LH, a esto habría que añadir que la FSH no tiene mucha influencia dada la poca variación que existe de esta hormona en la sangre periférica en las distintas fases del ciclo.

Con concentraciones similares de gonadotropinas se ha propuesto que los altos ritmos de ovulación están asociados con una intensividad de liberación de las hormonas hipotalámicas e hipofisarias junto a los efectos de retroalimentación negativos de las hormonas gonadales y viceversa y que ya han sido analizados

en otra parte de esta memoria (vease '3.1. Control neuroendocrino del ciclo estral).

INSKEEP (1974) señala que la ovulación ocurre por lo general a las 24 horas de la aparición de los calores, apareciendo la elevación máxima de concentración de LH dentro de las 16 horas después de la aparición de los calores. El intervalo entre la liberación de LH y la ovulación es de 21 a 26 horas. No obstante estas cifras se pueden ver afectadas por una serie de factores entre los que cabe destacar el propio coito, ya que este acto acorta considerablemente el estro. La presencia continua de carneros con ovejas en celo acorta también el estro de las hembras (de ésto nos ocuparemos más adelante).

Por lo que se refiere a la funcionalidad de una u otra gónada, sabido es que ha sido discutido este punto para casi todas las hembras domésticas y por supuesto las ovejas no iban a ser una excepción. Conviene decir a este respecto, que muchas de las afirmaciones que se hacen en cuanto a funcionalidad de uno u otro ovario, están basadas en si él o los embriones se encuentran alojados en - uno u otro cuerno uterino, sin tener en cuenta la mayoría de las veces los fenómenos migratorios de los embriones de uno a otro cuerpo y que fueron descritos por primera vez por CURSON hace más de - 40 años.

Nos parece oportuno reseñar aquí con cierto detalle el trabajo de CASIDA y col. (1966), trabajo que ha entrado por su valía a formar parte de las citas clásicas en este tipo de estudios.

El trabajo de estos autores se refiere a la influencia de la raza y de la alimentación, sobre un colectivo de 676 ovejas a lo largo de 5 años diferentes, con respecto al número de cuerpos luteos y su presencia en el ovario derecho o izquierdo. Este trabajo preciso del sacrificio de los animales, por lo general, a los 140 días de gestación, aunque algunas ovejas lo fueron el día 25.

Los resultados indican que el 51,92% de las ovejas presentan ovulaciones simples y que en el 61,8% de estas ovejas los cuerpos luteos se encuentran en el ovario derecho. El resto de las ovejas, ésto es 325 muestran ovulaciones múltiples estando localizados los cuerpos luteos el 55,5% de las veces en el ovario derecho, con lo que esta cifra es 6,3% más inferior que en el caso de ovulaciones simples. Ahora bien estas cifras pueden complicarse y de hecho así sucede cuando se presentan cuerpos luteos en ambos ovarios.

Los datos que proporcionan CASIDA y col. (1966) se presentan en la siguiente tabla:

	D-1/I-0	D-0/I-1	D-2/I-0	D-1/I-1	D-0/I-2
Nº total de ovejas	161	106	55	87	32
Nº total de cuerpos luteos	161	106	110	174	64
Nº total de embriones	126	78	71	120	38
% de embriones emigrados	10,3	7,7	32,4	0	26,5

Por otro lado y consecuente a otros datos, no incluidos en esta tabla, se dedujo que la supervivencia de embriones originados en el lado izquierdo es ligeramente menor que para aquellos que se originan a partir del lado derecho.

Por lo que a migraciones se refiere, el valor es más alto hacia el cuerno uterino opuesto en ovejas con dos CL en el mismo ovario. No aparecieron migraciones en un CL en cada ovario. Un punto determinante de estas migraciones fue la presencia de otro embrión en el mismo lado, mientras que si este segundo embrión se encontraba en el lado opuesto la emigración no aparecía.

La existencia o no de una hipertrofia ovárica compensatoria de la falta de actividad de una de las gónadas ha sido objeto de muchas especulaciones y otras tantas discusiones, el tema no está del todo aclarado pero MALLAMPATI y CASIDA (1970) encuentran que en efecto no existe una hipertrofia compensatoria en las ovejas utilizadas por ellos en la experimentación, pero eso sí encuentran unos cambios significativos en la actividad folicular ovárica durante el anoestro. El mecanismo de la hipertrofia compensatoria se ha explicado, apuntan estos autores, sobre la base de la existencia de un aumento considerable de las gonadotropinas debido a la disminución de los niveles de estrógenos. Siendo precisamente la actividad esteroidogénica del ovario funcionante la que puede marcar la pauta de la hipertrofia en el sentido de que si la liberación de estrógenos es suficientemente alta, se estimulará el hipotálamo y éste a su vez hará que la hipófisis libere las correspondientes gonadotropinas.

El mecanismo de la liberación del oocito se ve acompañado de una serie de mecanismos fisiológicos, biofísicos y bioquímicos que HAFEZ (1980) resume en la siguiente tabla:

REACCIONES FISIOLÓGICAS		RESPUESTA FISIOLÓGICA
INICIACIÓN DE LA OVULACIÓN	aumento de irrigación al ovario disociación de cumulus	reanudación de la <u>mei</u> osis.
	aumento y cambio de la secreción de esteroides → edema  progesterona → colagenasa tecal  $PGE_2$ → activador plasminógeno  Prostaglandi nas de granu losa  $PGF_2$ → ruptura de li sosomas en epi telio apical	formación del estigma
	Contracción de las fibras de la muscula tura ovárica	rotura del folículo
	Contracción de los elementos folicula res	expulsión del oocito
maduración citoplasmática del oocito  multiplicación de lisosomas en el epi telio ovárico en el vértice del folicu lo ovulatorio		fin de la ovulación y formación del cuerpo hemorrágico

Veamos por separado algunos de estos mecanismos:

i/ mecanismos neuromusculares

Como se sabe el ovario posee una buena innervación adrenérgica y colinérgica, particularmente en la teca externa del folículo. Existen allí receptores alfa adrenérgicos y otros colinérgicos responsables de la contracción, la acción dilatadora depende de receptores beta adrenérgicos. Estos receptores repercuten asimismo sobre la presión intrafolicular.

En efecto, la pared folicular contiene un sistema de musculatura lisa innervado por el sistema vegetativo. La activación de estos nervios puede modificar la tensión de la pared folicular y afectar a la presión del interior del folículo. Las contracciones ováricas, que se manifiestan durante el intervalo periovulatorio están influenciadas por la progesterona y los estrógenos.

ii/ mecanismos intraováricos

Los esteroides sexuales así como las prostaglandinas, sintetizados todos en los folículos preovulatorios juegan un importante papel en el mecanismo de la ovulación. Es posible que las fluctuaciones cíclicas que de los niveles de esteroides y prostaglandinas existen sean los causantes de las alteraciones estructurales relacionadas con las enzimas lisosomales que son las responsables de la debilidad y ruptura del apéndice folicular.

El crecimiento, maduración, ovulación y luteinización de los folículos de Graaf depende de un modelo apropiado de secreción, suficiente concentración y adecuada relación de FSH y LH en el su-



ro. Las células granulosas de los folículos primarios, dispuestas en una única capa, poseen receptores específicos de las gonadotropinas como se ha expuesto anteriormente. La intensidad de unión a células granulosas individuales no aumenta aunque proliferen para formar folículos primarios de capas múltiples. No obstante, gran parte de la granulosa no retiene a esos receptores gonadotropínicos. Es posible que el número de lugares específicos de unión por célula decline a causa de las mitosis repetidas. De ahí que no se puedan detectar nuevos lugares de unión hasta que no se sinteticen, pero a medida que los folículos crecen, las células tecaales se diferencian y se desarrollan nuevos lugares de acoplamiento.

Existe una interacción funcional entre las células de la teca y las de la granulosa con el aumento de producción de progesterona y estrógenos por parte de la teca. Este hecho puede explicar, al menos en parte, la disminución de la concentración de estradiol en el estadio preovulatorio. En el líquido folicular existen valores altos de 17 beta estradiol y valores bajos de progesterona, en el momento que la concentración sanguínea al estradiol alcanza el máximo. La morfología de la pared folicular en los folículos preovulatorios y anovulatorios cambia de acuerdo con el modelo de actividad secretora.

Las gonadotropinas provocan una secuencia de efectos -- bioquímicos y fisiológicos en el folículo preovulatorio. La LH se une a sus respectivos receptores en el folículo y estimula la síntesis local de prostaglandinas. Como se ha dicho este mecanismo -- parece afectar al AMP cíclico y requiere una concomitante síntesis

de protefnas. Inicialmente, la acumulación de AMP cíclico activa a una proteinokinasa que a su vez estimula la síntesis de prostaglandinas.

Las prostaglandinas contribuyen notablemente a la contractibilidad ovárica y a la ovulación, mientras que si la síntesis de las prostaglandinas se inhibe (por ejemplo con la administración de indometacina) se evita la ovulación inducida por gonadotropinas. Digamos a este respecto que la ovulación puede inhibirse por los agentes que eviten las concentraciones ováricas.

Los niveles de prolactina según HAFEZ (1980) siempre -- que estén dentro de los valores admitidos como fisiológicos no parece que influyan críticamente en las funciones ováricas. Los efectos antigonadotrópicos de la hiperprolactinemia se ejercen a nivel ovárico. Las concentraciones de prolactina son extremadamente variables a lo largo del ciclo. Pudiéndose afirmar que: los valores más bajos están el día 13, los más altos están a las 6-12 horas, del estro aunque existe también una gran variabilidad individual (BJERSING, 1972).

Los estímulos sensoriales procedentes de los factores - exeroceptivos así como los estímulos internos producen en las fibras nerviosas encefálicas la liberación de neurotransmisores que regulan la secreción de hormonas hipotalámicas, éstas a su vez y como ya hemos dicho, a través del sistema porta hipotálamo-hipófisis alcanzan esta última glándula, donde producen la secreción de las gonadotropinas correspondientes; el siguiente paso también co

nocido, es que las homonas hipofisarias LH y FSH regulan la función ovárica e intervienen en ese mecanismo de retroalimentación tan importante para que la hembra pueda regular sus propios ciclos de reproducción.

3.5.1.- Factores comportamentales que afectan a la ovulación

LINDSAY y col. (1980) resumen en el siguiente cuadro -- los efectos del macho sobre la fisiología de la reproducción en la hembra:

Estado fisiológico	Efecto	Especie
En la pubertad	Aparición mas temprana y sincronica de la pubertad.	Ratona Oveja Cerde
Durante el anoestro	Estro sincronizado y ovulación	Oveja
En el estro	Acortamiento del periodo de calores	Oveja
	Ovulación más temprana	Oveja Cerde

La presencia continua de machos, introducidos antes de la madurez fisiológica puede adelantar la aparición de la pubertad; si la pubertad se adelanta artificialmente, mediante la administración de gonadotropinas a corderas éstas regresan con bastan

te rapidez al estado prepuberal a menos que se las haga permanecer en estado cíclico mediante la introducción de carneros maduros.

LINDSAY y SIGNORET (1980) citando a OLDHAM (1980) dicen que la merina australiana puede estimularse con gran eficacia e - incluso inducirla a la reproducción en cualquier tiempo del año - si se las estimula por la presencia del macho más de seis semanas antes de la aparición natural de la estación de reproducción, una gran proporción de ovejas regresará al estado de anoestro aún cuando los carneros estén junto a ellas. El estímulo posterior de estas hembras depende de si se las aísla cuatro semanas antes de que vuelva a reactivarse el efecto del macho. Se ha demostrado que los niveles plasmáticos de LH de las ovejas eran altos dos horas después de mantenerlas junto a carneros y que la liberación pulsátil de la LH estaba aumentada tanto en frecuencia como en intensidad.

El poderoso papel fisiológico del efecto del macho queda bien ilustrado por el hecho de que hay una mayor incidencia de ovulaciones múltiples en la ovulación estimulada que en la próxima - ovulación. La significación y las razones de estos hechos no son bien conocidos. El cuerpo luteo que se forma tras el estro estimulado por la presencia del carnero a menudo es de calidad variable. Esto es, algunos pueden persistir como en un ciclo estral normal, regresando alrededor del día 13 después de la ovulación y otros - pueden regresar prematuramente de tal forma que al 6-8 día la oveja re-ovula; OLDHAM y MARTIN (1979) encuentran este fenómeno de ciclos cortos casi en la mitad de las ovejas por ellos estudiadas.- El comportamiento estral no es común en los animales estimulados.

Siguiendo con el cuadro de LINDSAY y col. (1980) es conveniente indicar algo respecto a la presencia de los machos en el período de estro. Efectivamente se ha podido comprobar que ovejas sincronizadas con el método tradicional (progestágenos + PMSG) -- ovulan unas ocho horas antes cuando existen carneros en el mismo aprisco. Este fenómeno, sin duda, tiene unas grandes implicaciones en los programas de Inseminación Artificial donde el tiempo de inseminación relativo a la ovulación es vital para una buena fertilización.

A conclusiones similares llegan ALONSO DE MIGUEL y COGNIE (1980) que indican un aumento de la ciclicidad por la presencia de machos en el rebaño, ciclicidad que estos autores comprueban no solo por la aceptación del macho sino por la determinación de los niveles de progesterona plasmática, método que parece más idóneo al menos desde el punto de vista de estudio.

LOPEZ SEBASTIAN y col. (1980) encuentran mejor tasa de concepción en los lotes de ovejas en que no había presencia de mo rucos, y que se habían tratado con progestágeno durante catorce días.

### 3.6.- CUERPO LUTEO

El cuerpo luteo de los mamíferos puede considerarse como una glándula efímera. En el animal cíclico, tiene una vida media - característica para cada especie, secreta progesterona durante un período de tiempo limitado y luego regresa, una muerte temprana, - llamada luteolisis, que queda abolida en caso de gravidez ya que - para la implantación del blastocito primero y el desarrollo embrio nario después se precisa de la secreción de esta hormona. El man- tenimiento y función del cuerpo luteo es el resultado de una inter acción compleja entre las gonadotropinas hipofisarias, prolactina, hormonas liberadoras, prostaglandinas, esteroides y otros factores in traováricos como la foliculostatina (SEIDEL y col., 1980).

Todavía DENAMUR y col. (1973) tratan de aclarar la pre- gunta de como el cuerpo luteo del ovario de la oveja reconoce la presencia del embrión en el útero. Para ello llevan a cabo una se rie de experimentos muy interesantes, desde el punto de vista prác tico y llegan a la conclusión de que el efecto inicial del produc to de la concepción es únicamente antiluteolítico, situación que cambia posteriormente ya que a los 30-60 días de gestación, se -- comporta como anti-luteolítico y luteotrófico, con todo no está - definida, por el momento, según los autores, la naturaleza de esas sustancias luteotróficas secretadas por el embrión. Conclusión que a pesar de haber transcurrido ya más de 8 años desde que esos au- tores lo afirmaran, no existen conclusiones claras a este respecto. "

Debemos insistir pues que aún no está muy claro como el -

producto de la concepción indica a la oveja de su presencia en el útero; de cualquier forma existe el requisito imprescindible para el establecimiento y mantenimiento de la gravidez de que el ciclo ovárico cambie y se prolongue la actividad funcional del cuerpo luteo. En la oveja parece que esa señal se transmite aún antes de que el tejido embrionario se una intimamente al epitelio uterino, lo que es claramente distinto de la implantación. En la oveja el efecto más temprano del producto de la concepción sobre la progesterona plasmática se evidencia el día 16 después de la ovulación (SHEMMESH, 1980). Según este autor se puede resumir que existen tres posibles modos de acción del concepto sobre la ciclicidad de la progesterona.

- 1.- Tanto la progesterona como los estrógenos producidos por los blastocitos pueden actuar directa o indirectamente para suprimir la liberación uterina de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ .
- 2.- Los blastocitos pueden secretar una anti-prostaglandina sintetasa o alternativamente una sustancia capaz de bloquear la liberación de ácido araquidónico uterino.
- 3.- La actividad semejante a la gonadotropina coriónica producida por el blastocito podría actuar localmente estimulando la secreción de progesterona directa o indirectamente a través de la esteroidogénesis aumentada del blastocito.

Los datos experimentales que hasta el momento se poseen son insuficientes para hacernos inclinar por cualquiera de estas tres suposiciones e incluso dejar de lado las otras.

El cuerpo luteo posiblemente tiene un efecto estimulante sobre el desarrollo folicular y la ovulación. Ha sido ampliamente demostrado que la presencia de un cuerpo luteo previamente formado incrementa la eficacia de la PMSG para inducir la ovulación en la oveja.

Tratando de estudiar esta problemática DUFOUR y col. (1972) diseñaron un experimento para determinar los efectos de la presencia o ausencia del cuerpo luteo así como de la destrucción o integridad de los folículos macroscópicamente visibles sobre el ulterior crecimiento folicular. El diseño experimental incluye -- cuatro grupos de ovejas: i) operación simulada; ii) con el cuerpo luteo extirpado; iii) folículos destruidos y iv) cuerpo luteo extirpado y folículos destruidos: Todas las operaciones quirúrgicas se practicaron a los 8 días del estro bajo anestesia general. La extirpación de los cuerpos luteos se hizo mediante presión con -- los dedos y posterior electrocoagulación y la destrucción de los folículos mediante cauterización. A los animales pertenecientes -- al grupo i se les practicó la laparotomía y se manipuló en sus -- ovarios.

De las observaciones de estos autores se deduce que --- cuando se extirpa el cuerpo luteo y se destruyen los folículos, -- el intervalo entre la operación y la aparición del estro se pro-- longa notablemente siendo mucho mayor que cuando permanecen intac-- tos los folículos. Este retraso en la aparición del próximo estro sin duda es debido a que los pequeños folículos que se respetaron, ya que solo se extirparon los grandes folículos superficiales y -



muy visibles, necesitan de un tiempo de maduración para que puedan producir cantidades de estrógenos suficientes que conduzcan al estro.

Aunque los resultados de este trabajo demuestran una interrelación intraovárica entre cuerpo luteo y folículos, parece lógico pensar en la existencia de un mecanismo que afecte también a las gonadotropinas hipofisarias. En efecto, ya se ha demostrado la importancia de interacción entre la LH y la FSH sobre el desarrollo folicular, de tal forma que estas dos hormonas administradas simultáneamente producen la formación de folículos mayores y consecuentemente un mayor crecimiento uterino. Sin embargo, ninguna de esas dos hormonas administradas por separado son capaces de estimular el desarrollo folicular o el crecimiento uterino. Se afirma pues que la interacción entre las dos gonadotropinas condiciona el desarrollo folicular durante el ciclo estral de la oveja.

La destrucción de los folículos impide unos niveles fisiológicos de estrógenos que estimulen adecuadamente la liberación de FSH; por otra parte, la extirpación de los cuerpos luteos condiciona unos niveles de progesterona incapaces de regular correctamente la liberación de FSH y LH. De todo ello se deduce que tanto los folículos como los cuerpos luteos del ovario influyen decisivamente sobre los ciclos estrales fisiológicos de la oveja. Por otra parte también parece lógico anotar que de los resultados de DUFOUR, GINTHER y CASIDA (1971) se deduce que el cuerpo luteo favorece el desarrollo folicular, al menos en parte, por medio de un mecanismo intraovárico local.

Por otro lado, algunos folículos no son capaces de ovular, se trata de folículos quísticos (ABAD, 1980) cuya ausencia - de ovulación se debe a que en la oveja, como ya hemos analizado, se producen varias oleadas de crecimiento folicular pero solo los que se hallan en fase de crecimiento en el momento que tiene lugar la descarga preovulatoria de LH, ovulan después de sufrir todo tipo de modificaciones (crecimiento, permeabilidad, esteroidogénesis, etc.) que han quedado reflejados en los apartados anteriores.

La irrigación de los cuerpos luteos ha sido motivo de - atracción para muchos investigadores por cuanto conociendo el flujo de sangre a estas estructuras pueden comprenderse algunos de - los acontecimientos que allí se operan. En este sentido BRUCE y MOOR (1976) utilizando la técnica de introducción de microesferas radiactivas, determinan el flujo de sangre a los cuerpos luteos, al estroma y a los folículos y sus variaciones en los días 14, 15 y 16 del ciclo y llegan a la conclusión de que el estroma es la parte que cuenta con menor flujo de sangre, la parte más irrigada -- son los cuerpos luteos, y no parece que exista diferencia significativa cuando existen folículos atrésicos y que los cambios de -- flujo no se cree que sean los responsables de iniciar o controlar la activación, función esteroidogénica o atresia de los folículos.

En efecto, el desarrollo folicular y la maduración no - están relacionados con cambios consistentes del flujo de sangre - folicular.

Otros hechos que demuestran esos autores son resumidos

de la siguiente forma:

- a - El flujo de sangre a los folículos atrésicos es excepcionalmen  
te alto y es del mismo orden que el ritmo de flujo a un CL to  
talmente funcional.
- b - El flujo de sangre a los folículos atrésicos se mantuvo a un  
nivel alto aún en estadios avanzados de degeneración folicular.  
Por ello, aunque la involución del CL esté acompañada de un -  
fuerte descenso del flujo sanguíneo, la involución de sus pre  
cursores celulares (células granulosas) tiene lugar en presen  
cia de un nivel excepcionalmente alto de flujo.
- c - El mayor aporte absoluto de sangre se apreció en los folículos  
de mayor tamaño aún cuando el aumento de masa tisular no se -  
vea acompañado de aumento de flujo; por tanto, el aporte rela  
tivo es menor para los folículos grandes que para los pequeños.  
Esto significa que los folículos grandes, incluso aquel que -  
está destinado a ovular, no reciben un aporte supletorio de -  
sangre por esta circunstancia.

#### 3.6.1.- Regresión del cuerpo luteo

En la oveja, el cuerpo luteo del ciclo estral comienza a decaer histológicamente a partir de las 12 horas después del es  
tro y actualmente nadie duda de la intervención del útero en la -  
regresión del cuerpo luteo del ovario en la oveja no grávida, a -  
los ya clásicos trabajos de WILTBANK y CASIDA (1956) que demostra  
ron la prolongación y persistencia de los cuerpos luteos tras la  
histerectomía, hay que añadir otros destacando entre ellos los de  
MOOR y col. (1970) que pretenden aclarar la naturaleza del estímu

lo lítico del útero y precisar el tiempo durante el cual esa influencia lítica es necesaria para la regresión lutea. En este sentido los autores mencionados, plantean un diseño experimental muy completo con un total de 51 ovejas no grávidas. El día 15 del ciclo practican una laparotomía a la vez que extraen 10 ml de sangre de la vena principal que drena el ovario que contiene el cuerpo luteo, se señaló este cuerpo luteo y se extrajo el útero inmediatamente. Se dejó a los animales en un parque de recuperación - junto a carneros vasectomizados y aquellas hembras que no mostraron estro a los 5 días de la histerectomía, fueron examinadas posteriormente los días 25, 50 y 100. Se practicó una segunda laparotomía, extrayendo la misma cantidad de sangre que anteriormente y luego se sacrifican los animales, recogiendo los cuerpos luteos y fijándoles en líquido de Bouin (la composición de este líquido se facilita en el apartado de material y métodos).

En un segundo experimento y con el fin de inducir la -- aparición de cuerpos luteos en ambos ovarios, se trató a un grupo de 11 ovejas con una inyección subcutanea de 750 U.I. de PMSG, el día 12 del ciclo. A los 15 días de que los animales hubieran retornado al estro se extrajeron 10 ml de la vena principal que drena cada ovario, quitando a la vez el útero y uno de los ovarios - que se fijaron en el líquido anteriormente citado. El cuerpo luteo del otro ovario fue señalado y dejado en el animal. Los días 18 ó 19 del ciclo las ovejas fueron anestesiadas de nuevo, se tomaron nuevas muestras de sangre y posteriormente sacrificadas recogiendo las muestras de los ovarios que todavía permanecían "in situ" y -

tanto las muestras de sangre como las de los órganos extraídos -- fueron procesados adecuadamente para su estudio.

De los resultados encontrados por MOOR y col. (1970) se pueden deducir los siguientes hechos: la involución del cuerpo luteo de la oveja, durante el proestro, puede quedar detenida al retirar el útero aún cuando el tejido luteo haya marcado ya una regresión morfológica y funcional. Sin embargo, si el cuerpo luteo está casi infuncional en el momento de la histerectomía, entonces la regresión lutea se completa sin que se vea afectada por la operación. Se deduce pues que la presencia del útero es esencial tanto para la iniciación como para la continuación de aquellos procesos que conducen a la muerte de las células luteínicas.

Por el momento no existe un método seguro para determinar los cambios degenerativos iniciales que aparecen en el cuerpo luteo. La determinación de la concentración de progesterona en la sangre de la vena uterina solo se puede considerar como un valor indicativo de la actividad secretora del cuerpo luteo, sería preciso poder determinar con toda exactitud, a la vez, el flujo sanguíneo, para poder conocer la actividad de ese cuerpo luteo, ya que no existe una correlación entre número de cuerpos luteos y concentración de progesterona en la sangre de la vena ovárica, lo que hace pensar en la existencia de un aumento compensatorio del flujo de la vena ovárica.

Los análisis de sangre extraída el día 15 del ciclo mostraron que había pocas muestras con concentraciones intermedias --

de progesterona, lo que sugiere que la secreción de esteroides se detiene muy rápidamente. La correlación entre parámetros bioquímicos y morfológicos fue muy buena. En el momento de la caída de la concentración de progesterona en el plasma se observó, al menos - en algunas de las células luteínicas, cariorresis; con niveles inferiores de progesterona se observaron cambios degenerativos evidentes y extensos en cuanto a número. No obstante, desde el punto de vista histológico parece como si la extirpación del útero no - evitara la muerte de las células luteínicas que ya habían comenzado a involucionar en el momento de practicar la histerectomía. -- Sin embargo, aquellas células que estaban aún funcionales en el - momento de la operación permanecieron en estado funcional al menos durante 85 días más.

En las ovejas con superovulación, como consecuencia de la administración de PMSG, y con cuerpos luteos en ambos ovarios, la ovariectomía unilateral puede que conduzca a una elevación compensatoria en la concentración de progesterona en la vena efluente que procede del ovario intacto.

MOOR y col. (1969a) estudian el efecto que pueda tener sobre el cuerpo luteo el producto de la concepción en las distintas fases de la gravidez de la oveja y llegan a la conclusión de la existencia de una relación local entre el producto de la concepción y el cuerpo luteo de la oveja al menos durante el primer tercio de la gravidez. Hasta el día 50 de la gestación el "feto" confinado en un cuerno uterino es capaz de mantener el cuerpo luteo del ovario adyacente, más adelante ya es capaz de mantener --

los cuerpos luteos indistintamente de la lateralidad.

Por otro lado MOOR y col., (1969b) observaron, en otro trabajo tratando de conocer el efecto de la gonadotropina exógena sobre el feto y el cuerpo luteo de la oveja preñada, que la administración de gonadotropina a la oveja preñada produce un alto índice de muertes fetales (44%) y que la subsiguiente regresión del cuerpo luteo es producida por la ausencia de un feto viable dentro de la cavidad uterina. Pero conviene señalar que la muerte del producto de la concepción no es debida a la propia gonadotropina como en un principio pudiera sospecharse, sino más bien, creen -- los autores, que la administración de PMSG induce a un desarrollo folicular con la consiguiente producción de estrógenos, que en definitiva serían los causantes de la muerte fetal.

BAIRD y col. (1973) al hablar del ciclo ovárico dicen -- que la secreción de progesterona procedente del cuerpo luteo depende de la secreción basal de LH hipofisaria. Junto con los estrógenos foliculares, la progesterona incita a la secreción de una -- sustancia líftica procedente del endometrio en los días 14 ó 15 del ciclo. El cuerpo luteo regresa y, al descender la secreción de progesterona, se desarrolla el nuevo folículo aumentándose la secreción de  $17\beta$  estradiol. Estos acontecimientos inducen a i) comportamiento de celo en el animal y ii) una descarga de LH hipofisaria mediante un mecanismo de retroalimentación positivo. Al ocurrir -- la ovulación se desarrolla un nuevo cuerpo luteo.

Esta cadena de acontecimientos se debe interrumpir por parte del embrión en caso de que la oveja haya quedado grávida.

Tratando de conocer de una forma definitiva cuales son las sustancias y/o factores que intervienen en el mecanismo luteolítico son muchos los trabajos que se han realizado en tal sentido; intentaremos resumir los más notorios o, cuanto menos, las -- que parecen estar más en consonancia con los verdaderos acontecimientos.

En este sentido se sabe que la prostaglandina  $F_{2\alpha}$  es un factor luteolítico en las ovejas no preñadas, donde se transfiere desde la vena útero-ovárica a la arteria ovárica; por ello, parecería lógico pensar que el feto mantiene al cuerpo luteo al suprimir la síntesis o la liberación de la prostaglandina citada. Sin embargo, son varios los autores (entre ellos LEWIS y col. 1976) -- que han encontrado que la concentración media de  $PGF_{2\alpha}$  en el endometrio y plasma venoso uterino son más altos en las ovejas preñadas que en las vacías entre los días 11 a 16 después del estro. -- La prostaglandina  $F_{2\alpha}$  inyectada intrafolicularmente el día 12 post-estro no produce regresión lutea en las ovejas con embriones viables pero sí lo produce en las no preñadas (INSKEEP y col., 1975). Aparentemente, lo que sucede es que el producto de la concepción produce o estimula la producción de una o varias sustancias antiluteolíticas (PRATT y col., 1977).

El trasplante de embriones a porciones aisladas de útero parece tener una influencia local sobre el cuerpo luteo. Se ha demostrado también (PRATT y col., 1977) que la vena uterina principal y la arteria ovárica son los componentes proximal y distal de una ruta veno-arterial local que está implicada en el efecto anti-



luteolítico. Este efecto antiluteolítico, puede estar relacionado con una molécula fácilmente metabolizable y se sabe que la prostaglandina  $E_2$  actúa opuestamente a la  $PGF_{2\alpha}$  en otros tejidos. En -- efecto, la prostaglandina E difiere de la F en cuanto a estructura, aquella posee un grupo cetónico y ésta un hidróxilo, en el -- carbono nueve. Para confirmar esta hipótesis PRATT y col. (1977) diseñaron una serie de experimentos llegando a las siguientes conclusiones: el tratamiento con prostaglandina  $F_2$  acorta el ciclo -- estral de la oveja alrededor de 1,5 días siempre que no se hayan cruzado o que, si hubo cruce, no quedara preñada; de los análisis de las distintas hormonas en las diferentes fases del ciclo y la preñez en correlación con la administración de prostaglandinas ha ce suponer que la gravidez vence a los efectos luteolíticos de la prostaglandina  $F_{2\alpha}$ , esto es tiene un efecto antiluteolítico; por otra parte se demostró que la prostaglandina  $E_2$  tiene actividad -- antiluteolítica en ovejas pero sin efecto esteroidogénico "in vivo".

Dos años más tarde, los mismos autores (PRATT y col., - 1979) siguiendo en la misma línea de investigación trataron de de mostrar si la administración continua de prostaglandina  $E_2$  puede mantener una función lutea local sin que se afecten las concentraciones de LH en el plasma periférico o las de la prostaglandina --  $F_{2\alpha}$  en el plasma de la vena uterina, se valieron para ello de una técnica muy ingeniosa consistente en la introducción, dentro del lumen del cuerno uterino, de un mini-aparato que iba desprendiendo la prostaglandina a diferente ritmo, variable a voluntad. Sin

entrar en detalles de la técnica, por salirse un poco de nuestros objetivos, lo más importante es decir que la administración de PGE aumenta la varianza pero no la duración media del ciclo estral en la oveja, retarda la vuelta a la normalidad de la concentración de progesterona al final del ciclo estral, sin que se afecte la secreción de LH. La prostaglandina  $E_2$  tiene, en definitiva, un efecto antiluteolítico en algunas ovejas.

La secreción de prostaglandinas por parte de distintas estructuras del aparato genital de la oveja puede estar estimulada incluso por factores mecánicos, tal es el caso estudiado por PEXTON y col. (1975) que encuentran que la introducción de un aparato intrauterino en uno o ambos cuernos produce un nivel plasmático (plasma de la vena uterina) de prostaglandina F más alto que en las ovejas control. Los niveles son también más altos en los tejidos caruncular, intracaruncular y miometral de las ovejas con aparato intrauterino que en los testigos.

De estos hallazgos se deduce que los aparatos intrauterinos tienen un efecto luteolítico ya que al incrementar la secreción de prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ésta, como se sabe, posee efectos líticos sobre el cuerpo luteo.

En relación con este tema diremos que GINTHER y BISGARD (1972) observaron que la acción luteolítica de un aparato intrauterino contralateral a un cuerpo luteo lleva aparejado un camino directo entre los cuernos uterinos y que esta ruta no se efectúa a través del lumen o tejidos uterinos.

En otro trabajo, sobre la misma línea (PEXTON y col., - 1975) indican que la prevención de la luteolisis por la gravidez, medida al día 15, no parece que esté relacionada con cambios en los niveles de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  transportada o captada por el ovario o el tejido lúteo.

La infusión de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  produce una degeneración de las células luteas, según demuestran STACY y col. (1976) algunas células aparecen encogidas y las células endoteliales de los vasos sanguineos se encontraron globosas dentro del lumen del capilar. Dentro de las células luteas se observaron orgánulos degenerativos (cuerpos autofágicos). También se observó un aumento notable de las gotas lipídicas.

No parece que esté muy claro (STACY y col., 1976) el medio por el cual la prostaglandina ejerce su acción sobre la estructura y función de las células luteas. La prostaglandina puede que actúe directamente sobre las células y por tanto inhibe la esteroidogénesis o bien puede ejercer su efecto indirectamente al reducir el flujo sanguíneo, y por ello reducir el aporte de nutrientes al tejido secretor.

La extensiva formación de gotitas lipídicas, por otra parte, es un claro signo morfológico de que las células luteas han alcanzado un estadio de eminente desorganización de la estructura celular.

SHERIDAN y col. (1975) por su parte indican que la regresión lutea en la oveja se debe a una interacción compleja entre estradiol, prostaglandina  $\text{F}_{2\alpha}$ , progesterona y LH.

Hablando de la luteolisis parece interesante incluir - aquí la hipótesis de HENDERSON y McNATTY (1975) en el sentido de que la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  inicia la luteolisis al interferir la estimulación - de la adenil-ciclasa por la gonadotropina, de esta forma se inhibe el AMP cíclico y se produce una disminución de la síntesis de progesterona; al mismo tiempo indican que la citada prostaglandina interferiría también la síntesis de progesterona por parte de la gonadotropina, pero la  $\text{PGE}_2$  no lo haría por tener un receptor distinto.

Según KINDAHL y col. (1980) la liberación de prostaglandina  $\text{F}_{2\alpha}$  a partir del útero, al final de la fase lutea concuerda con el descenso de la concentración de progesterona en la oveja. La liberación de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  durante el ciclo estral es de capital importancia ya que parece que sea el único factor luteolítico liberado a partir del útero, limitante de la vida del cuerpo luteo y por ello controlador de la duración del ciclo estral.

Durante la regresión, la prostaglandina inhibe uno o más estadios de la esteroidogénesis con lo que los lípidos se acumulan en forma de gotitas de ester de colesterol en las células lúteas. Esta afirmación está en consonancia con las caídas de progesterona observadas el día 15 del ciclo siendo precisamente en este tiempo cuando las citadas gotitas se hacen profundamente dispersas en los citoplasmas de las células luteas (STACY y col., 1976).

El aumento de la actividad lisosomal es uno de los primeros cambios relacionados con la regresión lutea y por ello se puen

sa que tengan un importante papel en la involución del cuerpo luteo en la oveja no grávida.

El incremento de la fragilidad lisosomal que se observa alrededor del día 15 del estro puede que esté relacionado tanto con la rapidez como con la especificidad de la regresión lutea y poder así explicar la caída fulminante de la concentración de progesterona ya que esta caída de actividad secretora se ve acompañada de cambios citológicos y bioquímicos localizados inicialmente en las propias células luteínicas. A la luz de los estudios de DINGLE y col. (1968) (estudios que aunque un poco más lejanos que los ya expuestos, los citamos precisamente por el aporte que en aquella fecha supuso) parece deducirse que la influencia lítica del útero afecte directamente a los lisosomas; el aumento de su fragilidad puede que sea la causa primaria de la regresión lutea. También es posible que se vean afectados otros elementos, que no lisosomas, de la célula luteínica, la afectación lisosomal sería secundaria, pero no por ello menos importante. Una situación análoga puede deberse al antisuero-complemento que, aunque produce cambios en la actividad lisosomal, no tiene acción directa sobre los lisosomas ya que parece actuar produciendo cambios en la membrana celular.

Para STABENFELDT y col. (1980) la función lutea puede prolongarse por: 1) acúmulo de líquidos, 2) fetos momificados ó 3) cambios degenerativos graves dentro del endometrio; todos estos factores condicionan un fallo de síntesis de la prostaglandina  $F_{2\alpha}$  con la consiguiente prolongación de la fase luteica.

En relación con la producción de prostaglandinas por -- parte del tracto genital de la oveja INSKEEP y col. (1980) señalan que:

- i - Las concentraciones en el endometrio y plasma de la vena uterina son bajas al principio del estro, aumentando considerablemente hacia los días 11-12 y más en los 13-14.
- ii - La secreción de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  se efectúa en forma de picos con frecuencia, magnitud y duración variables.
- iii - Estos picos, no cesan hasta que aparece o está -- próximo a aparecer el estro y en caso de fecundación, las concentraciones endometriales y en el plasma de la vena uterina permanecen altas al menos hasta el día 18 de la gravidez.

Para concluir este apartado de las prostaglandinas y su papel en el aparato reproductor de la oveja señalamos los cambios fisiológicos que se producen cuando se administra exógenamente --  $\text{PGF}_{2\alpha}$ : lo más llamativo es un descenso drástico de la progesterona en la sangre periférica, comenzando a los 10 minutos de practicada la inyección. Al descender la progesterona se elevan los estrógenos y aumentan también los niveles de LH. También se han descrito liberación de prolactina y hormona del crecimiento tras la administración de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (INSKEEP y MURDOCH, 1980).

Ha sido motivo de gran polémica la ruta que las sustancias luteolíticas llevan hasta alcanzar la gónada. Por ello consi

deramos oportuno señalar parte de lo escrito sobre el tema teniendo en cuenta además que esas mismas vías son las que vamos a utilizar para la perfusión ovárica en nuestra experimentación.

CAMPO y col. (1974) estudian las relaciones histológicas entre la vena útero-ovárica y la arteria más próxima a ella, en la oveja. La pared de cada vaso, indican estos autores, en las zonas donde ambos están yuxtapuestos, es completa; sin embargo, los haces de tejido conectivo de la adventicia en esas mismas zonas forman un único estrato de tal forma que la demarcación entre los vasos queda muy mal definida. La anchura media de la pared de la arteria y la anchura media de la pared de la vena fueron significativamente menores en el área de yuxtaposición de los dos vasos que a 90, 180 y 270 grados, hacia la derecha, de dicho área. La anchura de la capa circular de músculo liso de la arteria, pero no de la vena, fue significativamente menor en el área de yuxtaposición que en los otros tres puntos anteriormente reseñados. En la mayoría de las secciones, siguen afirmando los autores, se evidenciaron gran cantidad de venulas en el tejido conectivo, inmediatamente externo a la adventicia de la arteria.

Estas relaciones histológicas entre los dos vasos pueden favorecer el paso directo de una sustancia luteolítica uterina entre la vena útero-ovárica y la arteria ovárica.

Sin embargo, en el mismo año de la publicación de esos autores (1974) COUDERT y col. haciendo un estudio de la circulación útero-ovárica en la oveja refiriéndose fundamentalmente al transporte local entre sangre arterial y venosa, llegan a la con-

clusión de que en sus disecciones no encontraron comunicación directa entre los vasos arteriales y venosos, por ello, dicen, no se puede seguir manteniendo la idea de una comunicación arterio-venosa local para una presuntiva luteolisina uterina. Para llegar a esa afirmación y un poco resumidamente los autores afirman que:

- i - La vena útero-ovárica está formada por la convergencia de tres grandes e importantes venas: la rama posterior está representada únicamente por la vena uterina anterior, la rama interna está formada por la (o las) venas ováricas y la rama anterior es una vena procedente del infundubulum y las fimbrias.
- ii - La arteria ovárica surge de la aorta y camina libremente durante 1 ó 2 cm, sin que conecte con ningún otro vaso, para después hacerlo con la vena útero-ovárica. En este punto sigue un trayecto tortuoso sobre la cara anterior de la vena, sin arrollarse a ella. Cerca del lugar donde comienza la vena útero-ovárica, la arteria ovárica se divide en tres ramas principales:
  - a) una rama sobre la superficie de la vena uterina anterior,
  - b) una rama que se arrolla alrededor de la vena infundibular, y
  - c) una rama mayor que forma una red helicoidal arterial alrededor de la vena ovárica.

Aunque la arteria ovárica, por lo general, transcurre en



dirección opuesta a la vena uterina anterior, la red arterial no es ni enteramente paralela ni está estrechamente relacionada con esta vena. Solamente se relaciona con la vena por yuxtaposición, no por íntima asociación y el espacio que existe entre ambos vasos está cubierto por tejido conectivo, linfáticos y un poco de grasa.

Volviendo a la polémica de que unos autores afirman que puede haber conexiones para el paso de factores luteolíticos (CAMPO y col., 1974) y otros que no (COUDERT y col., 1974), estos últimos indican que se pueden postular varias rutas para el transporte local de un factor luteolítico uterino: (a) el oviducto, (b) los conductos linfáticos, ó (c) conexiones vasculares. Por lo que se refiere a esta última ruta, los autores citan a varios otros - investigadores (ZHORDNIA y GOTSRIÐZE, 1963; NISWENDER, 1968; MELAMPY y ANDERSON, 1968, etc.) que también afirman que no son necesarias rutas locales directas entre el útero y los ovarios para que ocurra la regresión del cuerpo luteo en la oveja.

Existen también objeciones anatómicas y fisiológicas al concepto de un transporte local de factor lítico. En efecto, si la vena uterina anterior fuera la ruta exclusiva de transporte, parecería lógico que ese transporte se efectuara entre este vaso y la arteria ovárica. Sin embargo, bueno será recordar que el compartimento venoso es un sistema de baja presión mientras que el arterial lo es de alta presión con lo que tal inversión de transporte de sangre es una imposibilidad fisiológica. Por otro lado, desde el punto de vista anatómico parece casi imposible pensar que un -

factor lítico sea incapaz de atravesar una capa delgada venosa y sí lo sea de atravesar una gruesa pared arterial. Ese transporte, si ocurriera, tendría que efectuarse únicamente en la porción de la arteria ovárica que se adhiere a la vena útero-ovárica. De cualquier forma y como decíamos al principio de estas consideraciones COUDERT y col. (1974) ponen muy en duda la existencia de ese intercambio, teniendo presente que estos autores llegan a tal afirmación después de trabajar experimentalmente con xenon radiactivo - que lo introducen de varias formas con la ayuda de catéteres, midiendo luego el paso de gas a través de esas posibles conexiones arteriovenosas.

Sin embargo, GINTHER y col. (1973b) al afirmar que existe un estrecho contacto entre las venas ováricas y las arterias - del mismo nombre indican que se pueden considerar las siguientes áreas de contacto:

a) el tercio inicial del área convoluta de la rama ovárica de la arteria del mismo nombre: la vena uterina principal -- contacta con las convoluciones arteriales, pequeñas venas anastomóticas conectan la principal vena uterina y una red venosa colateral que rodea la arteria y una vena prominente conecta la vena -- principal del útero a la rama ovárica de la vena útero-ovárica.

b) área de unión de las venas principales del útero y - del ovario, que forman la vena común útero-ovárica, la arteria -- ovárica es muy tortuosa y queda adosada a la superficie de unión encontrándose arrollada 1 cm ó más a los canales colaterales de - la vena útero-ovárica.

c) a lo largo de toda la longitud de la vena útero-ovárica: la arteria ovárica se encuentra muy tortuosa y muy en contacto con la vena, estando la arteria enmallada por venulas que se originan a partir de los canales colaterales de la vena útero-ovárica.

Estas tres áreas juntas forman una gran superficie de contacto entre las paredes de las venas y venulas que contienen sangre venosa uterina y la pared de la arteria que irriga el ovario con lo que se permite el paso directo de la sustancia luteolítica uterina desde la sangre venosa uterina a la arteria ovárica.

En otro trabajo, los mismos autores GINTHER y col.(1973a) confirman que el efecto luteolítico local del útero se ejerce a través de una ruta venoarterial entre el cuerno uterino y su vena ovárica adyacente y que en esta ruta existen venas que drenan el cuerno uterino (componente proximal de esa ruta) y la arteria ovárica ipsilateral (componente distal).

Por lo expuesto, no parece que esté del todo aclarado si hay o no conexión arterio-venosa para el paso de sustancia (s) luteolítica (s).

### 3.7.- SINCRONIZACION DEL CELO

Independientemente de que en la parte correspondiente - de discusión se haga la crítica de cada uno de los métodos que se vienen utilizando para sincronizar el celo en las ovejas, parece conveniente que en esta parte de revisión bibliográfica nos ocupemos de hablar algo de una de las sustancias que se emplea en casi todos los sistemas de sincronización y que, por supuesto también hemos utilizado nosotros. Nos referimos concretamente al suero de yegua preñada o gonadotropina sérica (PMSG), sin hablar ahora nada de la progesterona o sustancias progestágenas por cuanto en -- los apartados anteriores consideramos que han quedado suficientemente expuestas sus acciones y sus mecanismos de actuación.

La PMSG es una hormona de molécula sencilla que posee - tanto actividad FSH como LH. Se presenta en altas concentraciones en el suero de yeguas preñadas y mantiene su actividad durante -- años, bien congelada como suero en bruto o bien en polvo liofilizado tras precipitarse por acetona. El alto contenido de ácido n-acetil-neuramínico que tiene la molécula de PMSG le confiere una vida media mucho mayor que las de LH o FSH. Por ejemplo, en la vaca el coeficiente de depuración de la PMSG afecta a un componente rápido ( $t_{0,5}$  40-50 horas) y otro lento ( $t_{0,5}$  118-123 horas). En la -- oveja existen dos componentes similares: valor medio  $t_{0,5} = 21$  - horas. Estos altos valores de vida media de la PMSG contrastan con los valores tan bajos que presentan la FSH y la LH (110 y 20 minutos, respectivamente en la rata, según GAY y col., 1970). Esta propiedad capacita a la PMSG para que pueda administrarse como inyec-

ción única, en contra de las aplicaciones múltiples que requieren las gonadotropinas hipofisarias. Sin embargo, esta lentitud de depuración de la PMSG puede tener la desventaja de inducir un excesivo grado de desarrollo folicular en algunos animales, aunque este inconveniente se puede soslayar optimizando el grado de depuración de la PMSG mediante el uso de neuraminidasa, que disgrega parcialmente la molécula hormonal, MOYLE y col. (1978) encuentran más efectiva la hormona así tratada que la sin tratar.

La gran variabilidad de respuesta folicular que en un principio se encontró para una dosis estandar de PMSG se pensó podía ser debida a las diferencias en la relación FSH:LH, en la propia hormona; sin embargo, estudios más recientes han demostrado que esa relación, medida mediante radiorreceptor y bioanálisis "in vitro", permanece bastante estable a lo largo de la gravidez de la yegua y que no parece ser muy variable en los distintos lotes de PMSG comercial (STEWART y col., 1976). Por otro lado, cuando se comprobó la eficacia de la hormona, procedente de varios lotes, en número considerable de ovejas, no se encontraron diferencias significativas en cuanto a acciones totales si bien algunos individuos respondieron variablemente (NEWCOMB y col., 1979). Estos hallazgos no excluyen la posibilidad de que la relación FSH:LH de la PMSG pueda ser un factor importante al determinar la eficacia de esta hormona fundamentalmente porque es muy difícil de medir la actividad gonadotrópica "in vivo" de la PMSG.

Ahora parece estar bastante claro que la PMSG, al igual que otras gonadotropinas, está compuesta de una subunidad alfa que

estructuralmente es similar en todos los casos, y de una subunidad beta que es la responsable de la actividad biológica que exhiben las hormonas intactas. Por ello, la subunidad  $\beta$  de la PMSG es la responsable tanto de la actividad FSH como de la actividad LH de la hormona, aunque debe unirse a la subunidad  $\alpha$  para proporcionar una actividad biológica total. Aunque se conocen las secuencias de las subunidades  $\beta$  de la FSH y LH de muchas especies domésticas al igual que se han identificado los lugares de recepción para las mismas, esta información por el momento no es conocida para la PMSG; no se sabe, por ejemplo, si hay dos receptores de unión separados para FSH y LH en la propia molécula y si estos están dependientes o no uno del otro. Los datos analíticos preliminares indican que la secuencia existente en la PMSG es muy similar a la de la LH y se ha sugerido que solo existe un cambio de un aminoácido para que tenga actividad como la FSH (MOOR y col., 1980). Si esto es cierto resultaría relativamente fácil influenciar sobre la actividad FSH de la PMSG sin alterar su actividad LH. Por el momento, las modificaciones de la aludida relación no son posibles y se desconocen las repercusiones que pudiera tener en el campo de su aplicación.

Los folículos de diferente tamaño y en distinto estadio de involución responden de una manera muy distinta a la PMSG. La administración de esta hormona ejerce los siguientes efectos sobre la población folicular (vease figura 8).

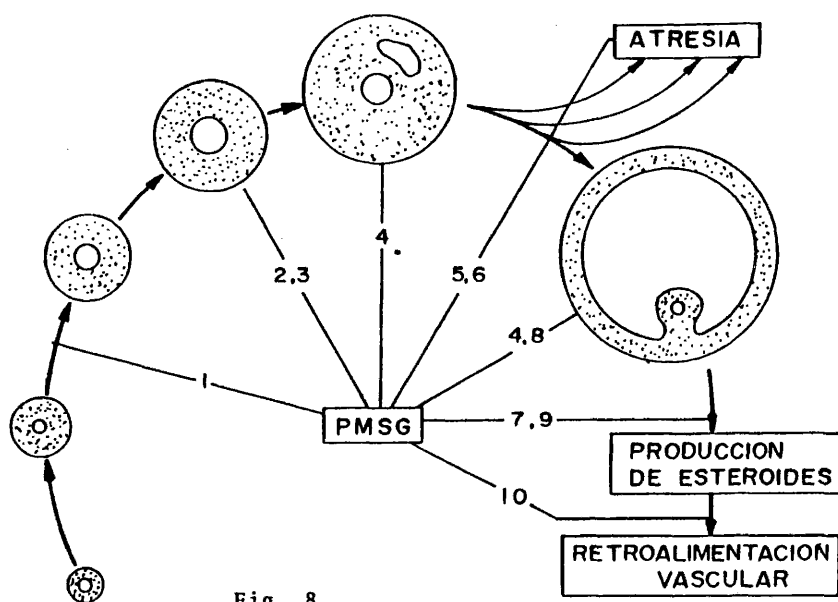


Fig. 8

Según MOOR y col. (1980):

- i) Aumenta el número de folículos primordiales que constituyen la fase de crecimiento.
- ii) Se encuentran más folículos preantrales que formas normales.
- iii) Se reduce el tamaño del folículo en el que ocurre la formación del antrum.
- iv) Aumenta los ritmos de crecimiento en los folículos antrales más pequeños y mayores, al aumentarse el ritmo de crecimiento en los folículos más pequeños paralelamente se aumenta la síntesis de DNA.
- v) Probablemente desciende la proporción de folículos antrales que entran en atresia.

- vi) En algunas especies se observa una regeneración de folículos ya atrésicos. En contraposición, también puede ocurrir una pérdida de los folículos mayores debida a atresia inducida u ovulación prematura.
- vii) Aumenta la esteroidogénesis ovárica, particularmente en lo que a estrógenos se refiere.
- viii) Aumenta la proporción de folículos no atrésicos de mayor tamaño.
- ix) Se deshace el equilibrio ovárico de tal forma que la correlación entre el número de folículos en lugares próximos se destruye por completo.
- x) Se afectan otros sistemas tales como el sistema nervioso central y la vascularización ovárica aunque sea de una manera indirecta (por aumento de la esteroidogénesis).
- xi) A nivel intracelular afecta al metabolismo intermedio, a la síntesis de proteínas, al transporte de membrana, al acoplo intercelular y al desarrollo de receptores hormonales.

Se ha indicado que la administración de PMSG en la fase folicular aumenta el número, de folículos preovulatorios al decrecer el ritmo de atresia e incrementar el crecimiento de folículos antrales de mayor tamaño (DOTT y col., 1979). Conociendo el número y ritmo de crecimiento de los folículos de la oveja es posible calcular teóricamente el ritmo de ovulación tras la administración de PMSG, haciendo, eso sí, las siguientes consideraciones:



- a - la PMSG actua evitando que los folículos entren en atresia -- desde el día que se practica la inyección (día 12) hasta la ovulación, y
- b - la PMSG aumenta el ritmo de crecimiento folicular según la dosis administrada de tal forma que el crecimiento folicular se efectua en solo 5 días cuando el animal recibe una dosis alta (1500 U.I.) mientras que, si la dosis es moderada (750 U.I.) el crecimiento se efectua entre 7-9 días.

No obstante estas consideraciones teóricas se ven un poco apartadas de la realidad al tener que considerar el papel de - las gonadotropinas naturales que ocurren "in vivo" y no en el modelo teórico, pero no obstante facilitan una información de incalculable valor, por la correlación que existe entre el valor calculado y lo real.

La PMSG aumenta significativamente la frecuencia de las ondas electromiográficas con respecto al estro natural y disminuye la variabilidad observada después del tratamiento con progestágenos solos. Esta modificación de la actividad electromiográfica -- del miometrio es quizá, dicen PRUD'HOME y col. (1980) un factor - importante para mejorar el índice de fertilidad por el tratamiento con PMSG.

Recientemente se han realizado muchos avances positivos en lo que a la inducción de partos múltiples se refiere. Los autores suelen administrar PMSG al comienzo de la fase lutea mejor -- que al principio de la fase folicular. Los resultados demuestran una mayor proporción de gemelos obtenidos de ovejas tratadas durante

te la fase lutea del ciclo.

MOOR y col. (1980) citando a CAHILL y DUFOUR (1979) dicen que el excesivo desarrollo folicular que surge como consecuencia de la administración de PMSG está sujeto a un proceso normal de atresia; la administración de esa hormona durante la fase folicular condiciona una respuesta variable y excesiva por cuanto que no se impone un control fisiológico similar sobre los folículos - estimulados en ese tiempo. La acción atrésica en la oveja tratada en el inicio de la fase lutea es reducir el excesivo desarrollo - folicular a la vez que permite un pequeño aumento, controlado, del ritmo de ovulación.

En relación con el tema de la superovulación bueno será decir, para terminar este apartado que el aislamiento, caracterización estructural y manipulación química de los decapeptidos hipotalámicos u hormonas liberadoras de gonadotropinas hipofisarias - (Gn-RH) que intervienen en la liberación de gonadotropinas facilitan la posibilidad de inducir a la superovulación porque son capaces de liberar gonadotropinas endógenas. A pesar de los avances - realizados aún no se puede considerar como útiles la Gn-RH como medios satisfactorios para inducir a la superovulación. La administración de gonadotropina exógena, inicialmente de origen hipofisarios (FSH y LH) y luego la de origen coriónico (PMSG y HCG) permanecen como las únicas útiles para estimular el ovario. El surgir - de la PMSG como hormona dominante en la superovulación se ha debido a causa de su disponibilidad, su efectividad y la facilidad con que se administra.

162

#### 4.- MATERIAL Y METODOS

#### 4.1.- ANIMALES DE EXPERIMENTACION

Hemos dispuesto de un total de 38 ovejas de raza manchega, adultas, todas habían tenido más de tres partos, en buen estado de nutrición y salud.

Durante el tiempo que duró la experimentación las ovejas fueron alojadas en el Pabellón de Metabolismo, perteneciente al Departamento de Fisiología, de la Facultad de Veterinaria, disponiendo de un recinto donde quedaban guardadas en la noche, pasando la mayor parte del día en un patio adyacente.

Conviene advertir que fue difícil encontrar animales suficientes para constituir un lote de estudio, que mostraran el mismo estadio estral.

En ocasiones se ha precisado de un escalonamiento en el tratamiento de un mismo lote, pero consideramos como premis importante partir de fases cíclicas iguales para que los resultados pudieran ser comparados con más claridad, de tal forma que la administración del tratamiento hormonal comenzó en el período de diestro, diagnosticado mediante la citología vaginal, cuyos detalles de técnica se indican más adelante (vease 4.3.1).

Por otro lado, conviene advertir también que esperamos a la aparición de un segundo ciclo, antes de iniciar el tratamiento, precisamente para asegurarnos de su ciclicidad pues aunque se comenzó en el otoño, la época más idónea para este tipo de estu--dios, no todos los animales mostraron su ciclo con la misma facilidad. Esto fué motivo de que varios animales fueran rechazados,

de ahora en adelante solo trataremos de los animales que fueron -  
útiles para el ensayo.

Conociendo ya las premisas expuestas, los animales se -  
dividieron en los siguientes lotes:

Lote 1º

Integrado por 8 animales: letras D, E, L, N, U, I, GK y GL

Lote 2º

Integrado por 8 animales: letras GC, GD, GE, GF, GH, GI, GM y GN

Lote 3º

Integrado por 8 animales: letras A, H, J, O, S, X, GO y GP.

Lote 4º

Integrado por 14 animales: letras B, C, F, G, M, P, Q, R, T, V, Y,  
Z, GQ y GR

Todos los animales, tanto los que reciben el tratamiento  
hormonal como los testigos, fueron sometidos a un riguroso trata-  
miento antiparasitario para asegurar la mejor condición fisiológi-  
ca durante el estudio.

Antes de practicarse las administraciones de compuestos  
hormonales se tomaron muestras de sangre, siguiendo el proceder -  
que más adelante detallaremos, con el fin de conocer los niveles  
basales de hormonas. Estas muestras se tomaron posteriormente con  
intervalos de 24 horas. En los animales testigos se procedió tam-  
bién a recoger las respectivas muestras de sangre.

Terminado el período de experimentación, y con arreglo

a la secuencia que más adelante se detalla, los animales fueron trasladados al Matadero Industrial GIRESA de Colmenar Viejo (Madrid), donde fueron sacrificados siguiendo el proceder habitual para esta especie.

Inmediatamente de ser sacrificados, se recogieron las muestras de órganos, que tras de ser minuciosamente observados macroscópicamente se introdujeron en los conservadores pertinentes, que serán detallados para cada muestra.

CUADRO A

Días de expe- rimentación	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Tratamiento administrado	Pg		Pg			Pg			PMSG				
Animales tratados	U I L N D E												
Lote 19													
Lote 29	GE GF GC GD GH GI		GE GF GC GD GH GI										
Lote 39	A H J O S X		A H J O S X			A H J O S X							
Lote 49	M Q Y B C F G P V R T Z		M Q Y B C F G P V R T Z			M Q Y B C F G P V R T Z			M Q Y B C F G P V R T Z				

#### 4.2.- PROTOCOLO DE TRATAMIENTO EXPERIMENTAL (vease cuadro A)

##### Lote 1º

A excepción de las ovejas señaladas como GK y GL, que permanecieron como testigos, las otras recibieron una inyección, por vía intramuscular de 50 mg. de progesterona.

El intervalo de sacrificio de estos animales fue el siguiente:

2 ovejas (U, I) a las 24 horas de recibir la inyección.

2 ovejas (L, N) a las 48 horas de recibir la inyección.

2 ovejas (D, E) a las 72 horas de recibir la inyección.

Las otras dos que permanecieron como testigos fueron sacrificadas a las 72 horas de haber recibido una inyección de los excipientes que constituyen la forma farmacéutica de la progesterona intramuscular.

Las operaciones de recogida de muestras para el estudio anatomopatológico serán expuestas más adelante.

##### Lote 2º

Los animales de este lote, menos los testigos GM y GN, fueron tratados con dos inyecciones de 50 mg. de progesterona - cada una, administradas con intervalos de 72 horas, por vía intramuscular.

Los animales de este lote se sacrificaron con el siguiente intervalo:

2 animales (GF, GE) a las 96 horas de practicar la prime



ra inyección.

2 animales (GC, GD) a las 120 horas de practicar la primera inyección.

2 animales (GH, GI) a las 144 horas de practicar la primera inyección.

2 animales (GM, GN) a las 144 horas de practicarles la inyección de los excipientes.

Lote 3º

Las ovejas integrantes de este lote recibieron tres inyecciones de 50 mg, cada una, de progesterona, salvo los testigos GO y GP, que fueron inyectadas solamente con los excipientes.

Las inyecciones se practicaron los días 0, 3 y 6 de experimentación.

Los animales de este lote se sacrificaron de la siguiente forma:

2 animales (A, H) a las 168 horas de practicar la primera inyección.

2 animales (J, O) a las 192 horas de practicar la primera inyección.

2 animales (S, X) a las 216 horas de practicar la primera inyección.

2 animales (GO, GP) a las 216 horas de practicar la inyección de excipiente.

Lote 4º

Los animales de este lote recibieron el siguiente trata

miento:

Día 0 - 50 mg. de progesterona vía intramuscular.  
Día 3 - 50 mg. de progesterona vía intramuscular.  
Día 6 - 50 mg. de progesterona vía intramuscular.  
Día 8 - 500 U.I. de PMSG (gonadotropina sérica) vía intramuscular.

Los animales señalados con las letras R, T y Z podemos considerarlos como de repetición ya que este lote al recibir un tratamiento más completo nos interesaba disponer de mayor número de muestras.

Las ovejas GQ y GR permanecieron como testigos.

El sacrificio de los animales de este lote se hizo así:

3 animales (M, Y y Q) a las 240 horas de la 1ª inyección.

3 animales (B, C y F) a las 264 horas de la 1ª inyección.

6 animales (G, P, V, R, T y Z) a las 288 horas de la 1ª inyección.

2 animales (GQ y GR) a las 288 horas de recibir los excipientes del inyectable.

En el cuadro B se detalla el orden de sacrificio de todos los animales objeto de estudio.

CUADRO B

Horas transcurridas tras la 1ª inyección de progesterona (días)	24	48	72	96	120	144	168	192	216	240	264	288
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)
Animales sacrificados	U	L	D	GE	GC	GH	A	J	S	M	B	G
	I	N	E	GF	GD	GI	H	O	X	Q	C	P
			GK			GM			GO	Y	F	V
			GL			GN			GP			R
												T
												Z
												GQ
												GR

#### 4.3.- OBTENCION DE MUESTRAS

##### 4.3.1.- Citología vaginal

Los frotis vaginales se hicieron de la siguiente forma:

A primera hora de la mañana y con la ayuda de un espéculo se recogió una pequeña muestra de mucosidad vaginal en una torunda de algodón empapado en solución salina, mientras un ayudante sujetaba al animal. La muestra extraída se extendió sobre un porta de dimensiones normales y después de fijado en alcohol durante 2 horas se tiñó por el método de PAPANICOLAU y se observó al microscopio.

##### 4.3.2.- Perfusión ovárica

Gracias a la labor de entrenamiento realizada con ovejas no sometidas a tratamiento en el propio matadero, inmediatamente de ser sacrificadas pudimos perfundir con éxito total todos los animales en que era preciso este proceder.

Por las razones que se expondrán en el apartado de Discusión, se decidió que lo mejor sería perfundir ambos ovarios de una de las ovejas que constitufan los subgrupos de sacrificio, en cada lote de animales.

El líquido de perfusión fue el siguiente:

Etanol .....	85 partes
Formol .....	10 partes
Acido acético .....	5 partes

Se precisaron unos 2 ml de este líquido para la perfusión de cada ovario. No se puede dar cifra exacta de la cantidad de líquido perfundido ya que, factores como el tamaño del órgano, la sangría que se le practicara en el momento del sacrificio, postura del animal, etc. hicieron variar la cantidad administrada. - Se adoptó el criterio de perfundir hasta que se viera salir, por la circulación de retorno, líquido claro (exento de sangre).

Una vez perfundidos los ovarios siguieron el mismo tratamiento que los otros, donde no se había practicado tal perfusión y que fue el siguiente:

Se practicaron secciones muy delgadas de 1,5 mm, con la ayuda de un dispositivo de cuchillas paralelas teniendo en cuenta los siguientes criterios:

- a) tomamos las piezas de los folículos más grandes y no atrésicos.
- b) las secciones del ovario se hicieron siguiendo el plano sagital.
- c) introducción de las piezas en el mismo fijador que había servido para practicar la perfusión.
- d) 24 horas después se pasaron a formol al 10% donde permanecieron 24-48 horas.
- e) inclusión en parafina.

El proceso subsiguiente fue igual que para los otros órganos y se describirá más adelante.

Tanto en los ovarios perfundidos como en los que no habían sufrido esta operación se realizó un minucioso estudio macroscópico con el fin de conocer el número de folículos, en sus diversos estadios de desarrollo midiendo incluso el diámetro de los mismos - con la ayuda de un calibre.

Cualquier signo digno de tener en cuenta se ha registrado en el capítulo de Resultados.

#### 4.3.3.- Otros órganos del aparato genital

##### 4.3.3.1.- Trompas

Se tomó una muestra de cada una de las trompas, en la zona proximal, se mantuvo 24 horas en líquido etanol-formol-acético (85:10:5) y tras 24 horas en formol al 10% se incluyó luego en parafina y se siguió el proceso que se detallará más adelante.

##### 4.3.3.2.- Utero

De este órgano se tomaron tres muestras de cada uno: -- cuerno, cuerpo y cuello, cada una de las muestras estaba constituida por la mucosa uterina con alguna porción de músculo subyacente.

Las muestras de este órgano se fijaron e incluyeron de la misma forma que se ha descrito anteriormente.

Resumiendo, de cada subgrupo de animales tenemos las siguientes muestras:

Ovario perfundido, lado derecho

Ovario perfundido, lado izquierdo

Ovario sin perfundir, lado derecho  
Ovario sin perfundir, lado izquierdo  
Trompas, derecha e izquierda de los dos animales  
Cuerno uterino, derecho e izquierdo de los dos animales  
Cuerpo uterino, de los dos animales  
Cuello uterino, de los dos animales

Al disponer de un número tan elevado de muestras, dado que dispusimos de 13 subgrupos de dos animales, 2 subgrupos de tres animales y un subgrupo de seis animales, se ha hecho preciso el idear unos códigos de identificación. Códigos que han sido minuciosamente estudiados y posteriormente aplicados con sumo cuidado para no equivocar ninguna de las muestras.

#### 4.3.4.- Muestras de sangre para Radio-inmuno-análisis

Las muestras de sangre se tomaron en todos los animales (tratados y testigos) con intervalos de 24 horas. La recogida se hizo mediante punción en la vena yugular, recogiendo una muestra de unos 10 ml directamente a un tubo de plástico, provisto de aguja y heparinizado en el que se había hecho previamente el vacío. Se trata de los tubos comerciales conocidos con el nombre de "Vacutainer"..

Las muestras de sangre recogida de cada animal fueron centrifugadas durante 20 minutos a 4000 r.p.m. para extraer el plasma.

Inmediatamente de extraído el plasma se congeló a  $-30^{\circ}\text{C}$ , permaneciendo en este estado hasta su utilización para determinar la concentración de progesterona mediante radioinmunoanálisis (véase 4.5)

#### 4.4.- TECNICAS HISTOLOGICAS

##### 4.4.1.- Preparación de muestras para microscopía óptica

Con ayuda de un microtomo marca Leitz, se han practicado cortes de 7 micras que se iban recogiendo en baño de agua a 37°C.

Estas muestras se han montado en portas de 7,5 x 2,5 cm, incluyéndose en cada porta un número distinto de cortes según fuera la muestra de procedencia. Cada porta lleva grabado el mismo código que el bloque de parafina de procedencia.

Colocados los cortes en los portas se han teñido por el método de hematoxilina-eosina (H.E.) y/o de Van Giessen.

Las preparaciones una vez teñidas se protegieron con cubre-objetos de 24 x 60 mm que se adhiere con Bálsamo de Canadá.

Para el estudio de todas las preparaciones se utilizó microscopio marca Leitz (modelo Laborlux 12).

En el capítulo de Resultados se detallan los hallazgos más sobresalientes de los distintos animales que constituyen cada subgrupo de lote experimental. No se indican los hallazgos individualmente, dado que en la mayoría de los casos existe una superposición e igualdad de resultados.

##### 4.4.2.- Preparación de muestras para microscopía electrónica

Se han tomado muestras de los mismos lugares que para la microscopía óptica (ya detallada), salvo que en este caso las muestras eran de menor tamaño.



-176- .

Fijadas las muestras en glutaraldehido se incluyeron en resina plástica, constituyendo bloques debidamente codificados.

#### 4.5.- RADIOINMUNOANALISIS

Aproximadamente una hora antes de comenzar la reacción, se descongelaron las muestras de plasma en baño maría a 36°C.

Se toma una muestra de 0,5 ml. de plasma para proceder a la extracción de la progesterona, lo que se consigue con 5 ml de hexano, después de adicionar 1800 dpm de  $^3\text{H}$ -progesterona (80-110 Ci/mmol. Radiochemical Centre Amersham) al plasma. Una vez adicionado el hexano se agitan los tubos y se dejan en congelador a -15°C para obtener una mejor separación de las dos fases. Se evapora el hexano y a cada tubo se adicionan 300 µl de tampón fosfato (pH = 7) con gelatina al 1 por mil. Para el análisis se toman dos muestras de 100 µl, cada una y una tercera de 50 µl para determinar la recuperación.

Se dispone de curva estándar con 9 puntos de lectura, entre 0,0156 y 4,0 ng/ml de progesterona.

El análisis se hace con 100 µl de antisuero progesterona, diluido 1/6000 (referencia RAAC4, preparado en el INIA) con antígeno 11-hemisuccinato progesterona - BSA y 100 µl de  $^3\text{H}$ -progesterona en tampón fosfato (18000 dpm, 80-110 Ci/mmol. Radiochemical Centre Amersham) adicionados a los 100 µl de la muestra correspondiente. Se dejan en incubación toda la noche a 4°C.

La separación de progesterona libre y ligada se lleva a cabo con un doble anticuerpo "SMAC" (preparado en el INIA): 20 µl de una dilución 1/4 de suero anti-γ-globulina de conejo.

La fracción ligada se lee mediante los métodos estandar de centelleo líquido.

El porcentaje de recuperación está alrededor del 80% y el coeficiente de variación fue de 11 y 13,5 por 100 dentro y entre análisis, respectivamente.

Esta técnica del radioinmunoanálisis supera por su precisión a cualquiera de las que se venían utilizando con anterioridad (métodos químicos, cromatografía en capa fina, etc.) y que no vamos a exponer aquí por encontrarse en cualquier texto de analítica de uso corriente. Vamos a referirnos pues a la discusión de la metodología utilizada (SAIZ CIDONCHA, 1980).

La técnica consiste en poner en competición la progesterona problema contenida en el plasma sanguíneo de la hembra a investigar, con una cantidad conocida de progesterona radiactiva, frente al antisuero antiprogestero<sup>n</sup>a. Se añade además una cantidad calculada de gammaglobulina de conejo inespecífica, cantidad que viene dada por el test del segundo anticuerpo.

El primer anticuerpo se añade en defecto, de manera que sea capaz de combinarse con el 50 por 100 de toda la progesterona presente.

Después de una incubación a 40°C se añade el segundo anticuerpo, el cual forma un inmunoprecipitado con todas las gammaglobulinas de conejo presentes, es decir, con la inespecífica añadida y con todo el primer anticuerpo, que estará ya combinado con

la progesterona. El precipitado del 2º anticuerpo con la gammaglobulina inespecífica tiene como misión arrastrar, mediante una coprecipitación, el pequeño precipitado del segundo anticuerpo con el antisuero antiprogesterona combinado.

Centrifugamos y eliminamos el sobrenadante (fracción de progesterona problema y radiactiva no ligada). Se disuelve posteriormente el precipitado en etanol, y después de añadirle el líquido de centelleo se cuenta la radiactividad en el contador.

El anticuerpo antiprogesterona se satura de progesterona indiscriminadamente con la hormona problema y la marcada. Es evidente que si existe mucha cantidad de progesterona problema, y siendo fijas las de hormona marcada y antisuero, el complejo antisuero-progesterona llevará una pequeña proporción de marcada y -- una elevada proporción de problema, y viceversa.

Como contamos exclusivamente la fracción ligada, un bajo número de cuentas (poca radiactividad) significará unos altos niveles de progesterona en el plasma problema, y un elevado número de cuentas aparecerá en el caso de niveles bajos en el plasma.

En consecuencia podemos apuntar las siguientes ventajas de esta técnica:

1. Al eliminar el paso más largo del proceso clásico, -- la extracción y la posterior evaporación del disolvente ahorramos una considerable cantidad de tiempo por muestra.

2. En el método clásico, con carbón activo, la adición

de carbón en suspensión de tampón debe hacerse en frío y con continua agitación, lo que condiciona esta adición a trabajar en cámara fría y a no poder utilizar jeringas automáticas de volumen constante, pues en éstas no se garantiza la perfecta homogeneización de la suspensión.

En el sistema objeto de este trabajo, la adición del segundo anticuerpo se puede realizar con jeringa automática, a temperatura ambiente y sin agitación.

3. La separación con carbón viene condicionada a un tiempo exactamente fijado de actuación sobre la muestra. Cualquier imponderable puede obligar a la repetición de las muestras, al aumentar inesperadamente este tiempo de actuación, en el caso de un corte de fluido eléctrico, avería de la centrifuga, etc. La separación con segundo anticuerpo no presenta este problema.

4. La separación del sobrenadante en este sistema se realiza simultáneamente para todos los tubos, mientras que la separación con carbón exige depositar este sobrenadante, uno por uno, en los viales para ser contados.

Esto presenta la ventaja de una mayor rapidez, menor -- error, pues el volcado tubo a tubo no puede garantizar exactamente el mismo volumen por vial, y, sobre todo, una equiparación completa de los posibles errores a los estandard y a las muestras dentro de la misma serie.

5. Cinco o seis centímetros cúbicos de líquido de cente-

lleo por muestra son necesarios en el sistema del carbón, mientras que 1,5 c.c. bastan en el contaje en tubos de polipropileno.

6. El sistema directo, sin extracción, garantiza menos errores relativos, pues todas las operaciones son simultaneas y -- son iguales en todos los pasos, tanto en estandard como en mues-- tras. Además, al eliminar un paso engorroso, como es la extracción, aumentamos la fiabilidad comparativa de las muestras frente a las referencias, lo que aumenta, por tanto, la fiabilidad del sistema.

7. Finalmente, los cálculos matemáticos en este sistema desaparecen completamente, frente a los que son necesarios hacer -- en el clásico método de extracción con curva estandard.

Todas las determinaciones de Radioinmunoanálisis se han realizado en el Departamento de Reproducción Animal del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (Director: Prof. Dr. D. Tomás Pérez García).

182

## 5.- RESULTADOS

#### 5.1.- ESTADO GENERAL DE LOS ANIMALES

No se observó ninguna baja en los animales objeto de experimentación. Todas las ovejas presentaron un perfecto estado de salud ingiriendo satisfactoriamente las respectivas dietas de pienso.

Todos los animales, asimismo, soportaron con éxito, tanto el tratamiento a que fueron sometidos, como las operaciones de recogida del exudado vaginal para los exámenes citológicos.

Naturalmente, y como ha quedado dicho con anterioridad, solo nos referimos a los animales que entraron en experimentación, ya que fue preciso rechazar a otros animales que no cumplían los - requisitos de ciclicidad, estado de salud, etc., condiciones que - se habían señalado como previas para llevar a cabo el estudio.

El buen cuidado, la constante vigilancia y la administración de una dieta equilibrada consideramos que han sido los factores decisivos para que los animales hayan estado en perfecto estado de salud durante el tiempo que duró la experimentación, incluyéndose el de adaptación y selección para elegir a los animales - idóneos.



## 5.2.- ESTUDIO MACROSCOPICO

### 5.2.1.- Ovarios

#### LOTE 19:

##### Oveja U

Ovario derecho:

Mide: 2,00 x 1,50 cm.

Superficie externa: Presenta un aspecto irregular debido a la presencia de elevaciones y depresiones de pequeñas dimensiones posiblemente debidas a la presencia de folículos en distintas fases del desarrollo. No se aprecia ningún cuerpo luteo.

Al corte: la zona medular no está demasiado desarrollada.

Ovário izquierdo:

Mide 1,85 x 1,40 cm.

Superficie externa: Caracterizada por elevaciones y depresiones - que podrían corresponderse con folículos en distintas fases del desarrollo, el único dato a destacar es la presencia de un pequeño cuerpo luteo que hace un pequeño relieve sobre la superficie.

Al corte: la zona cortical con numerosos folículos en distintas - fases del desarrollo, destacando una pequeña cicatriz que pudiera corresponderse con un cuerpo albicans. La zona medular no está demasiado desarrollada.

##### Oveja I

Ovario derecho:

Mide 2,15 x 1,40 cm

Superficie externa: Presenta elevaciones y depresiones correspondientes a folículos en distintas fases del desarrollo, destacando una pequeña elevación de color amarillento correspondiente a un pequeño cuerpo luteo.

Al corte: en la zona cortical se puede comprobar la existencia de un pequeño cuerpo luteo, que mide 0,2 cm de diámetro. La zona medular no se encuentra demasiado desarrollada.

Ovario izquierdo:

Mide: 2,10 x 1,30 cm.

Superficie externa: Presenta pequeñas elevaciones y depresiones correspondientes a folículos en distintas fases del desarrollo.

Al corte: presenta numerosos pequeños folículos en distintas fases del desarrollo, siendo destacable un folículo posiblemente de Graaf de pequeño tamaño. La zona medular no está demasiado desarrollada.

#### Oveja L

Ovario derecho:

Mide: 2,28 x 1,52 cm.

Superficie externa: Destaca un cuerpo luteo que mide externamente 0,5 cm de diámetro, situado en uno de los polos del ovario. El resto de la superficie externa presenta elevaciones y depresiones correspondientes a folículos en distintas fases del desarrollo.

Al corte: destaca un gran cuerpo luteo que tiene 1 cm de diámetro existiendo también un folículo, posiblemente de Graaf, que tiene 0,4 cm de diámetro. El resto de la superficie de corte es zona medular sin estar ésta demasiado desarrollada.

Ovario izquierdo:

Mide: 1,97 x 2,00 cm.

Superficie externa: Destaca enormemente un gran cuerpo luteo que tiene 0,98 cm de diámetro externo. El resto de la superficie externa son elevaciones y depresiones correspondientes a folículos en distintas fases del desarrollo.

Al corte: el cuerpo luteo que hacía relieve sobre la superficie tiene de diámetros interiores 1,16 x 0,80 cm. El resto son 5 folículos en distintas fases de evolución, no destacando el desarrollo de la zona medular.

#### Oveja N

Ovario derecho:

Mide: 2,47 x 1,64 cm.

Superficie externa: Destacan dos elevaciones correspondientes a dos cuerpos luteos de gran tamaño que miden respectivamente 0,88 y 0,72 cm de diámetro exterior. El resto de la superficie externa son folículos en distintas fases del desarrollo.

Al corte: se aprecian distintos folículos en vías de desarrollo y dos cuerpos luteos que presentan el mismo diámetro que habíamos descrito anteriormente. La zona medular está muy desarrollada.

Ovario izquierdo:

Mide: 2,3 x 1,64 cm.

Superficie externa: Pequeñas depresiones y elevaciones correspondientes a folículos en distintas fases del desarrollo.

Al corte: se aprecia un folículo de mayor tamaño, habiendo quedado como una oquedad y que posiblemente corresponda a un folículo de Graaf. La zona medular tiene un gran desarrollo.

Oveja D

Ovario derecho:

Mide: 2,38 x 1,42 cm.

Superficie externa: Se pueden apreciar distintas elevaciones y depresiones correspondientes a folículos en distintas fases del desarrollo.

Al corte: presenta 5 folículos posiblemente de Graaf teniendo el más grande de todos 0,47 cm de diámetro. El resto es zona medular.

Ovario izquierdo:

Mide: 2,3 x 1,93 cm.

Superficie externa: Aparecen dos pequeños cuerpos luteos que miden 1,3 cm de diámetro exterior y están los dos contiguos.

Al corte: aparecen los dos cuerpos luteos, conservando las mismas dimensiones y además dos folículos de mayor tamaño que el resto -- que posiblemente pudieran corresponderse con 2 folículos de Graaf. El resto es zona medular.

Oveja E

Ovario derecho:

Mide: 2,36 x 2,05 cm

Superficie externa: Son destacables dos grandes cuerpos luteos -- que miden respectivamente 1,1 y 1,18 cm de diámetro y además -- existe otro pequeño cuerpo luteo que mide 0,48 cm y también se -- pueden apreciar distintas elevaciones y depresiones correspondientes a folículos en distintas fases del desarrollo.

Al corte: Se aprecian dos cuerpos luteos que miden 1,10 y 1,18 cm de diámetro y numerosos folículos en distintas fases de desarro--

llo, no estando demasiado desarrollada la zona medular.

Ovario izquierdo:

Mide: 1,83 x 1,23 cm.

Superficie externa: Se pueden apreciar elevaciones y depresiones sin presentar nada significativo.

Al corte: se pueden ver pequeñísimos folículos en distintas fases de desarrollo, destacando el hecho de que la zona medular ocupa la mitad de la superficie de corte.

En las ovejas pertenecientes al Lote 29 los hallazgos macroscópicos en los ovarios son los siguientes:

Oveja GE

Ovario derecho:

Mide: 1,54 x 1,37 cm.

Superficie externa: Presenta una gran elevación correspondiente a un cuerpo luteo que mide 0,85 cm de diámetro. El resto son folículos en distintas fases del desarrollo.

Al corte: Un gran cuerpo luteo como veíamos en la superficie externa situado en uno de los polos del ovario. No destaca el desarrollo del mesovario.

Ovario izquierdo:

Mide: 1,40 x 1,45 cm.

Superficie externa: Se pueden apreciar pequeñas elevaciones y depresiones correspondientes a folículos en distintas fases del desarrollo pero siendo muy pequeños de tamaño, destacando el volumen que ocupa el mesovario en la superficie externa.

Al corte: prácticamente 3/4 partes de la superficie de corte se -  
encuentran ocupadas por el mesovario, el resto son folículos en -  
distintas fases del desarrollo.

Oveja GF

Ovario derecho:

Mide: 1,8 x 2,1 cm.

Superficie externa: Destaca la presencia de un gran cuerpo luteo  
de 0,8 cm de diámetro, el resto de la superficie externa son folí-  
culos en distintas fases del desarrollo.

Al corte: el cuerpo luteo tiene un diámetro de 1,1 cm, además de  
varios folículos en diferentes fases de crecimiento destacando en  
tre ellos un folículo de paredes transparentes que tiene 0,59 cm  
de diámetro. No es destacable el desarrollo del mesovario.

Ovario izquierdo:

Mide: 1,6 x 1,2 cm.

Superficie externa: Elevaciones y depresiones correspondientes a  
folículos en distintas fases del desarrollo.

Al corte: es destacable el desarrollo del mesovario ocupando éste  
los 2/3 de la superficie de corte.

Oveja GC

Ovario derecho:

Mide: 2,07 x 1,79 cm.

Superficie externa: Es destacable un cuerpo luteo que mide 0,48  
cm de diámetro.

Al corte: presenta un cuerpo luteo que mide 1,16 cm y contigua a  
éste se puede apreciar una cavidad, teniendo 0,39 cm de diámetro,

que podría corresponder a un folículo de Graaf. Rodeando el cuerpo luteo y próximos a la superficie externa existen pequeños folículos en distintas fases del desarrollo.

Ovario izquierdo:

Mide: 2,09 x 1,64 cm.

Superficie externa: Destaca un pequeño cuerpo luteo de 0,3 cm de diámetro. El resto son folículos en distintas fases del desarrollo.

Al corte: numerosos pequeños folículos en distintas fases de crecimiento destacando el gran desarrollo que presenta el mesovario.

#### Oveja GD

Ovario derecho:

Mide: 2,05 x 1,48 cm.

Superficie externa: Destaca un cuerpo luteo que tiene 0,4 cm de diámetro, el resto son elevaciones y depresiones correspondientes a folículos en distintas fases del desarrollo.

Al corte: En el centro de la superficie de corte aparece un cuerpo luteo que mide 0,94 cm de diámetro, rodeándolo se encuentran numerosos folículos en distintas fases del desarrollo. Prácticamente no hay desarrollo del mesovario.

Ovario izquierdo:

Mide: 1,89 x 1,75 cm.

Superficie externa: Es destacable un cuerpo luteo de 0,9 cm de diámetro.

Al corte: Un cuerpo luteo con las mismas dimensiones que aparecía en la superficie externa, encontrándose al lado de éste un folículo

lo que presenta un color transparente y teniendo 0,4 cm de diámetro. No es destacable el desarrollo del mesovario.

Oveja GH

Ovario derecho:

Mide: 2,2 x 1 cm de diámetro.

Superficie externa: Destaca una elevación correspondiente a un folículo con paredes transparentes y que tiene 0,79 cm de diámetro y que pudiera corresponderse con un folículo de Graaf.

Al corte: El folículo que era evidente en la superficie externa - tiene aquí un diámetro de 0,6 cm, apareciendo además dos folículos en distintas fases del desarrollo. El mesovario es bastante - evidente (tiene una forma totalmente alargada).

Ovario izquierdo:

Mide: 2,09 x 1,33 cm.

Superficie externa: Es destacable una gran prominencia que podría corresponderse a un cuerpo luteo, teniendo claramente la apariencia de un cuerpo luteo una pequeña area de 0,48 cm de diámetro, - próximo a ésta se encuentra un folículo de 0,56 cm de diámetro -- que podría ser un folículo de Graaf.

Al corte: esa prominencia es realmente un cuerpo luteo con un diámetro interior de 0,85 cm, rodeándole se encuentra una oquedad correspondiente al posible folículo de Graaf que veíamos en la superficie, y que tienen un diámetro interior de 0,4 cm, además se pueden ver varios folículos en distintas fases de crecimiento. No hay gran desarrollo del mesovario.



Oveja GI

Ovario derecho:

Mide 1,96 x 1,78 cm.

Superficie externa: Una pequeña elevación correspondiente a un cuerpo luteo que tiene 0,46 cm de diámetro. El resto de la superficie externa son folículos en distintas fases del desarrollo.

Al corte: El cuerpo luteo que comenzaba a hacer relieve sobre la superficie tiene un diámetro de 1,05 cm; próximo a éste se encuentran varios folículos en distintas fases de crecimiento. Gran desarrollo del mesovario.

Ovario izquierdo:

Mide: 2,60 x 1,60 cm de diámetro.

Superficie externa: En uno de los polos de esta superficie aparece un cuerpo luteo que mide 0,77 cm de diámetro. El resto son elevaciones y depresiones correspondientes a folículos en distintas fases del desarrollo.

Al corte: aparece un gran cuerpo luteo que mide 1,16 cm de diámetro, el resto son folículos en distintas fases de crecimiento, no destacando el desarrollo del mesovario.

Los animales pertenecientes al Lote 39 de nuestra experimentación fueron las ovejas: A,H,J,O,S y X siendo los hallazgos macroscópicos de sus ovarios los que se exponen a continuación:

Oveja A

Ovario derecho:

Mide: 1,75 x 1,67 cm.

Superficie externa: Elevaciones y depresiones correspondientes a

folículos en distintas fases del desarrollo.

Al corte: se pueden apreciar pequeñas manchas de color caramelo que podrían corresponderse con cuerpos hemorrágicos. Destacando el desarrollo del mesovario en relación al parénquima.

Ovario izquierdo:

Mide: 1,50 x 1,10 cm.

Superficie externa: Destaca una gran elevación de paredes transparentes que podría corresponderse a un folículo de Graaf, este folículo al perfundir la arteria ovárica y por un exceso de presión estalló.

Al corte: Existía una porción equilibrada entre parénquima ovárico y mesovario. Destacando el folículo de Graaf y pequeños folículos alrededor de él, en distintas fases del desarrollo.

#### Oveja H

Ovario derecho:

Mide 1,55 x 1,40 cm.

Superficie externa: Numerosas elevaciones y depresiones correspondientes a folículos en distintas fases del desarrollo sin destacar nada significativo.

Al corte: Numerosos folículos en distintas fases del desarrollo, un pequeño folículo con paredes transparentes que podría corresponder a un folículo de Graaf y próximo a éste una pequeña mancha de color amarillento que podría ser un cuerpo hemorrágico.

Ovario izquierdo:

Mide: 1,55 x 1,10 cm.

Superficie externa: Destaca una pequeña prominencia de consisten-

cia firme que podría corresponder a un cuerpo luteo.

Al corte: Un pequeño cuerpo luteo de 0,3 cm de diámetro, el resto son folículos en distintas fases del desarrollo. Prácticamente no existe mesovario.

#### Oveja J

Ovario derecho:

Mide: 2,20 x 1,94 cm.

Superficie externa: Numerosas elevaciones y depresiones destacando entre éstas una de mayor tamaño que podría corresponderse con un folículo de Graaf o quístico.

Al corte: No existe ningún hecho significativo; el desarrollo del mesovario no es muy evidente.

Ovario izquierdo:

Mide: 2,75 x 1,84 cm.

Superficie externa: Destaca una pequeña elevación correspondiente a un cuerpo luteo que mide 0,40 cm de diámetro. El resto son folículos en distintas fases del desarrollo.

Al corte: Distintos folículos en varias fases del desarrollo. No es muy evidente el desarrollo del mesovario.

#### Oveja O

Ovario derecho:

Mide: 2,43 x 1,97 cm.

Superficie externa: Destaca una elevación correspondiente a un -- cuerpo luteo que mide 0,40 cm de diámetro. El resto son folículos en distintas fases del desarrollo.

Al corte: Ese cuerpo luteo tiene un diámetro interior de 0,5 cm. -

No es demasiado evidente el desarrollo del mesovario.

Ovario izquierdo:

Mide: 2,23 x 1,50 cm.

Superficie externa: Se observa en uno de los polos del ovario una gran elevación de paredes transparentes que mide 0,85 cm y que podría corresponder a un folículo de Graaf o quístico.

Al corte: Varios folículos en distintas fases de crecimiento. No es evidente el desarrollo del mesovario.

#### Oveja S

Ovario derecho:

Mide 1,80 x 1,70 cm.

Superficie externa: Se pueden apreciar 7 elevaciones que podrían corresponderse con folículos de Graaf o quísticos y entre ellos un pequeño cuerpo luteo, que mide 0,99 cm de diámetro.

Al corte: Ese cuerpo luteo presentaba una gran superficie de implantación teniendo un diámetro interior de 1 cm. No destaca el desarrollo del mesovario.

Ovario izquierdo:

Mide: 1,93 x 1,74 cm.

Superficie externa: Presentaba 4 folículos pequeños y un pequeño cuerpo luteo.

Al corte: Aparece un cuerpo luteo que no tiene ninguna relación con el que aparecía en la superficie externa y mide 1 cm de diámetro. No es destacable el desarrollo del mesovario.

Oveja X

Ovario derecho:

Mide: 1,82 x 0,94 cm.

Superficie externa: Destaca una elevación correspondiente a un -- cuerpo luteo que mide 0,3 cm de diámetro, el resto son folículos en distintas fases del desarrollo.

Al corte: El cuerpo luteo representa 1/3 de la superficie de corte teniendo un diámetro interior de 0,84 cm. No es destacable el desarrollo del mesovario.

Ovario izquierdo:

Mide: 1,7 x 1,1 cm.

Superficie externa: Se observan elevaciones y depresiones correspondientes a folículos en distintas fases del desarrollo.

Al corte: sin destacar nada significativo. el desarrollo del mesovario tampoco es evidente.

A continuación exponemos los hallazgos encontrados en -- las ovejas pertenecientes al Lote 40 y que, como ha quedado señalado en el capítulo de material y métodos, fue el lote que recibió el tratamiento completo; esto es, 3 inyecciones de progesterona y 500 U.I. de PMSG.

Oveja M

Ovario derecho:

Mide: 2,54 x 1,97 cm.

Superficie externa: Es destacable la presencia de dos cuerpos luteos que hacen relieve sobre la superficie y que miden respectivamente 0,52 y 0,74 cm de diámetro. El resto son folículos en dis-

tintas fases del desarrollo.

Al corte: Prácticamente la superficie de corte solo son esos dos cuerpos luteos que tienen unos diámetros interiores de 1 cm y 0,92 cm, dividiendo éstos a la superficie de corte en dos mitades prácticamente iguales. El resto de la superficie de corte es mesovario.

Ovario izquierdo:

Mide: 2,45 x 1,5 cm.

Superficie externa: Elevaciones y depresiones correspondientes a folículos en distintas fases del desarrollo repartidos por toda la superficie externa y en uno de los polos del ovario hay un pequeño cuerpo luteo que mide 0,42 cm de diámetro.

Al corte: Hay que destacar el gran desarrollo del mesovario ocupando los dos tercios inferiores de la superficie de corte. En el tercio superior podemos apreciar un cuerpo luteo que mide 0,6 cm de diámetro. Próximo a él se encuentra un folículo de Graaf y a su vez cercano a éste último hay una pequeña mancha de color caramelo que hacia relieve (muy pequeño) sobre la superficie y que podría corresponder a un cuerpo hemorrágico.

#### Oveja Q

Ovario derecho:

Mide: 2,6 x 1,8 cm. Macroscópicamente presentaba un tamaño mayor de lo normal de 2 x 1 x 0,5 cm.

Superficie externa: Es destacable una elevación correspondiente a un cuerpo luteo que mide 0,6 cm de diámetro. El resto son folículos en distintas fases del desarrollo.

Al corte: El cuerpo luteo representa la mitad de la superficie de corte teniendo un diámetro de 1,32 cm. No es destacable el desarrollo del mesovario.

Ovario izquierdo:

Mide 2,3 x 1,78 cm.

Superficie externa: Numerosas elevaciones correspondientes a folículos en distintas fases del desarrollo destacando un cuerpo luteo que tiene un diámetro exterior de 0,4 cm.

Al corte: La mitad de esta superficie se encontraba ocupada por un cuerpo luteo de gran implantación interna que medía 1 cm de diámetro, existiendo también 3 folículos de Graaf de 0,5 cm de diámetro. El resto es mesovario.

#### Oveja Y

Ovario derecho:

Mide: 1,62 x 1,4 cm.

Superficie externa: Varios folículos en distintas fases del desarrollo destacando entre éstos uno de mayor tamaño que podría corresponderse con un folículo de Graaf que mide 0,62 cm de diámetro.

Al corte: En el borde superior de la superficie de corte se ven varios folículos en distintas fases del desarrollo, destacando entre ellos uno de mayor tamaño, igual que ocurría en la superficie externa que podría corresponder a un folículo de Graaf. Además hay un gran desarrollo del mesovario.

Ovario izquierdo:

Mide 1,93 x 1,3 cm.

Superficie externa: Una elevación correspondiente posiblemente -- con un folículo de Graaf que mide 0,7 cm de diámetro externo, y -- un pequeño cuerpo luteo que mide externamente 0,3 cm de diámetro. Al corte: Numerosos folículos en vías de desarrollo además del fo lículo de Graaf que vemos en la superficie y que aquí tiene un diámetro de 0,84 cm y el cuerpo luteo que tiene un diámetro de -- 0,4 cm. Hay un gran desarrollo del mesovario.

Oveja B

Ovario derecho:

Mide: 2 x 1,6 cm.

Superficie externa: Dos cuerpos luteos resaltan notablemente so-- bre la superficie midiendo respectivamente 0,4 y 0,3 cm, además -- de un folículo de paredes transparentes haciendo relieve sobre la superficie que podría corresponderse con un folículo de Graaf que mide 0,2 cm de diámetro.

Al corte: Dos cuerpos luteos que miden respectivamente 0,93 y 0,7 cm de diámetro, varios folículos en distintas fases del desarrollo y muy próxima a la superficie aparece una mancha de color caramelo que podría ser un cuerpo hemorrágico. Gran desarrollo del meso vario.

Ovario izquierdo:

Mide: 1,93 x 1,5 cm.

Superficie externa: No presenta nada significativo.

Al corte: Aparecen varios pequeños folículos en distintas fases -- del desarrollo. Prácticamente toda la superficie de corte está -- ocupada por el mesovario.



Oveja C

Ovario derecho:

Mide: 2,1 x 1,5 cm.

Superficie externa: Destaca una elevación correspondiente a un cuerpo luteo que mide 0,75 cm y, próximo a éste, otro de menor tamaño (0,2 cm de diámetro).

Al corte: Se puede observar un gran cuerpo luteo de amplia base de implantación que mide 1,44 cm de diámetro y a continuación de éste, una pequeña mancha de color caramelo que podría corresponder a un cuerpo hemorrágico. No es destacable el desarrollo del mesovario.

Ovario izquierdo:

Mide 1,7 x 1,3 cm.

Superficie externa: No se observa nada significativo.

Al corte: Presenta un gran desarrollo del mesovario quedando el parénquima ovarico como un casquete alrededor del mesovario. En el parénquima ovárico podemos observar un folículo que posiblemente sea de Graaf que mide 0,4 cm de diámetro, el resto son 4 pequeños folículos en distintas fases del desarrollo.

Oveja F

Ovario derecho:

Mide 1,9 x 1,4 cm.

Superficie externa: Es destacable un cuerpo luteo que mide 0,4 cm de diámetro y una elevación 3 veces más amplia que ésta que podría corresponder a uno ó varios cuerpos luteos.

Al corte: Esa elevación de la superficie externa es un cuerpo lu-

teo con una gran base de implantación que mide 0,5 x 0,3 cm de -- diámetro. A ambos lados del mismo se pueden apreciar dos folícu-- los que posiblemente sean de Graaf que miden 0,5 cm de diámetro - además del cuerpo luteo que veíamos en la superficie.

Ovario izquierdo:

Mide: 2 x 1,5 cm.

Superficie externa: Destaca un cuerpo luteo que mide 0,4 cm de -- diámetro. El resto son folículos en distintas fases del desarro-- llo.

Al corte: Presenta un pequeño cuerpo luteo muy próximo al mesova- rio que era el que hacía relieve sobre la superficie y que mide - 0,5 cm de diámetro interior. Hacia la superficie se pueden obser- var distintos folículos en vías de desarrollo, debiéndose reseñar que muy próxima a la superficie se encuentra una pequeña mancha de color caramelo de 0,5 cm de diámetro que podría corresponderse con un cuerpo hemorrágico.

#### Oveja G

Ovario derecho:

Mide: 1,5 x 0,8 cm.

Superficie externa: Se observa una pequeña elevación, de paredes transparentes que podría corresponderse con un folículo de Graaf.

Al corte: Varios folículos en distintas fases del desarrollo y un folículo de Graaf o quístico de 0,4 cm de diámetro encontrándose en el centro de la superficie de corte, a su vez, próxima a éste, se encuentra una pequeña mancha de color caramelo que podría co-- rresponder a un cuerpo hemorrágico. No es destacable el desarro-- llo del mesovario.

Ovario izquierdo:

Mide: 3 x 2,5 cm.

Superficie externa: Una gran elevación correspondiente a un cuerpo luteo que mide 1 cm de diámetro. En el polo opuesto a donde se encontraba éste, otro cuerpo luteo de menor tamaño 0,3 cm y 4 folículos que posiblemente sean quísticos de 0,5 cm de diámetro el mayor.

Al corte: Es destacable el cuerpo luteo que tenía un gran tamaño en la superficie tiene aquí una gran base de implantación midiendo 0,4 cm. El resto son folículos en distintas fases del desarrollo. No es destacable el desarrollo del mesovario.

Oveja P

Ovario derecho:

Mide: 1,7 x 0,98 cm.

Superficie externa: Aparece un cuerpo luteo de 0,4 cm de diámetro siendo éste el hecho más destacable.

Al corte: Presenta un cuerpo luteo de amplia base de implantación y que representa un tercio de la superficie, próximo a éste se encuentran dos pequeños folículos de Graaf y una pequeña mancha de color caramelo que podría corresponder a un cuerpo hemorrágico. - El resto de esta superficie está ocupado por el mesovario.

Ovario izquierdo:

Externamente muestra un tamaño menor que el derecho.

Superficie externa: Hay dos grandes zonas depresibles que podrían corresponder a folículos de Graaf pero lo más evidente es una zona que hace prominencia, no presentando un aspecto definido y que

por su consistencia podría corresponder a un cuerpo luteo.

Al corte: En más de dos tercios de esta superficie se encuentran ocupados por un gran cuerpo luteo y alrededor de él varios folículos en distintas fases de crecimiento. No es destacable el desarrollo del mesovario.

#### Oveja V

Ovario derecho:

Mide 1,6 x 1,4 cm.

Superficie externa: Resaltan dos prominencias, una de mayor tamaño que la otra y que posiblemente sean folículos de Graaf. El resto son folículos en distintas fases del desarrollo.

Al corte: Presenta varios folículos de Graaf, quísticos o atrésicos en los cuales sus diámetros oscilan desde 0,1 a 0,5 cm. No destaca el desarrollo del mesovario.

Ovario izquierdo:

Mide: 1,70 x 1,45 cm.

Superficie externa: Muestra numerosas zonas fácilmente depresibles que podrían corresponder a folículos de Graaf, quísticos o atrésicos.

Al corte: Es notable el desarrollo del mesovario pudiéndose apreciar un pequeño cuerpo luteo y próximo a él un pequeño folículo posiblemente de Graaf o quístico.

#### Oveja R

Ovario derecho:

Mide 2,45 x 1,65 cm.

Superficie externa: Aparecen dos prominencias, correspondientes

a dos cuerpos luteos que miden respectivamente 0,53 y 0,5 cm de diámetro. El resto son folículos en distintas fases del desarrollo.

Al corte: Aparecen 3 cuerpos luteos que miden respectivamente 0,8, 0,64 y 0,77 cm y un folículo que podría ser de Graaf de 0,33 cm y otros más pequeños que éste. Los cuerpos luteos en cortes posteriores llegan a alcanzar diámetros máximos de 1,0, 0,85 y 0,8 cm. El mesovario está muy poco desarrollado.

Ovario izquierdo:

Mide: 1,67 x 1,34 cm.

Superficie externa: No destaca nada significativo.

Al corte: Un folículo, posiblemente de Graaf que tiene un diámetro de 0,4 cm pero en cortes posteriores llega a alcanzar un diámetro de 0,88 cm. No es destacable el desarrollo del mesovario.

#### Oveja T

Ovario derecho:

Mide: 2,16 x 1,43 cm.

Superficie externa: Es destacable una elevación correspondiente a un cuerpo luteo que mide 0,3 cm de diámetro.

Al corte: Se observa un gran cuerpo luteo de forma ovalada que tiene un diámetro mayor de 0,77 cm, alrededor de éste hay numerosos folículos en distintas fases del desarrollo. En el corte posterior aparece una gran oquedad ocupada por un material que ha tomado un color blanquecino que tiene un diámetro interior de 0,79 cm y que posiblemente sea un folículo quístico. El mesovario no tiene gran desarrollo y además se encuentra desplazado hacia un lado.

Ovario izquierdo:

Mide: 1,96 x 1,36 cm.

Superficie externa: Es bastante lisa siendo destacable una prominencia que posiblemente corresponda a un cuerpo luteo que mide 0,35 cm de diámetro y un folículo posiblemente de Graaf de 0,65 cm de diámetro.

Al corte: Además de un cuerpo luteo de 0,6 cm de diámetro. Este en cortes posteriores alcanza un diámetro mayor de 0,8 cm. No es destacable el desarrollo del mesovario.

#### Oveja 2

Ovario derecho:

Mide 1,57 x 1,36 cm.

Superficie externa: Es de notar una prominencia de 0,48 cm de diámetro que podría corresponder a un cuerpo luteo; otro cuerpo luteo claramente diferenciado de 0,26 cm de diámetro además de varios folículos en distintas fases del desarrollo.

Al corte: Un folículo que posiblemente sea de Graaf que mide 0,37 cm. El cuerpo luteo que en la superficie externa medía 0,48 cm, en corte mide ahora 0,37 cm. En un corte medial se observan numerosos folículos en distintas fases del desarrollo siendo el más destacable el que mide 0,37 cm de diámetro. El mesovario se encuentra bastante desarrollado en relación con el parénquima ovárico.

Ovario izquierdo:

Mide: 1,49 x 1,2 cm.

Superficie externa: Aparece un pequeño cuerpo luteo de 0,2 cm de

diámetro, además hay numerosas elevaciones de paredes transparentes que podrían corresponderse con folículos de Graaf, teniendo el mayor de ellos 0,65 cm de diámetro.

Al corte: Observamos varios folículos en distintas fases del desarrollo teniendo el mayor de ellos 0,65 cm de diámetro. En cortes posteriores el cuerpo luteo llega a alcanzar un diámetro de 0,55 cm. Hay bastante desarrollo del mesovario.

#### 5.2.2.- Trompas

Macroscópicamente no se observó ninguna alteración digna de resaltar en ninguno de los animales de cualquiera de los lotes. Unicamente nos encontramos que un animal (oveja J, lote 39) presentaba una de las trompas como si se encontrara obstruida la luz por una masa quística, de apariencia grasa, recogimos muestra para microscopía de la parte no afectada por esa masa.

#### 5.2.3.- Utero

Ninguno de los animales, ni tratados ni testigos presentó hallazgos dignos de mencionar aquí, en su estudio macroscópico. En el lumen de algunos animales encontramos abundante secreción, - que consideramos no es achacable al tratamiento de sincronización, sino que más bien parece debido a estar o haber estado presente - alguna infección bacteriana, de cualquier forma tampoco fue demasiado importante como para que se invalidaran los estudios que -- pretendíamos realizar.

### 5.3.- ESTUDIO MICROSCOPICO

#### 5.3.1.- Ovarios

En los ovarios pertenecientes a las ovejas del lote 1º, por lo general no se encuentran cuerpos luteos ya que solo dos de las ovejas de este lote presentaban, una de ellas (oveja N) uno - en su ovario derecho y otra (oveja D) dos en el ovario del mismo lado. Sin embargo, todos los ovarios tanto del lado derecho como del izquierdo presentan quistes foliculares, concordantes con lo descrito en el estudio macroscópico. En ninguno de los ovarios es tudiados se aprecian signos de degeneración.

En las ovejas pertenecientes al lote 2º aparecen quis--tes foliculares en todos los ovarios sin que haya preferencia por uno u otro lado, en una de ellas (oveja GI) se encontró un cuerpo luteo quístico en su ovario derecho. Observamos también cuerpos - luteos en mayor número que en el lote anterior si bien estos cuer--pos luteos están más localizados en los ovarios del lado izquier--do aunque los del otro lado también presentan algunos incluso al--gún ovario presenta más de un cuerpo luteo. En la oveja GF se apre--cia una degeneración del cuerpo luteo que presenta una intensa va--cuolización citoplasmática de las células luteínicas. Aparecen -- también cuerpos albicans en prácticamente todos los animales de - este lote; una oveja (GH) llega a presentar tres cuerpos albicans en su ovario derecho.

En las ovejas pertenecientes al lote 3º siguen aparecien--do quistes foliculares en casi todas ellas, cuerpos luteos mani--fiestos, algunos en fase de degeneración y bastantes cuerpos albi



cans.

Por lo que se refiere a los animales que recibieron el curso completo del sistema PG, concretamente el lote 40, los hallazgos más fundamentales estriban en una mayor presencia de cuerpos luteos, de preferencia localizados en el lado derecho sin que esta localización presuponga una mayor funcionalidad de dicha gónada; algunos de estos cuerpos luteos presentan signos de degeneración y otro hallazgo fundamental es la presencia de quistes foliculares en ambas gónadas.

Los hallazgos en los lotes testigos no difieren significativamente de lo anotado para el lote 10 por lo que no parece -- oportuna su repetición.

#### 5.3.2.- Trompas

No se han encontrado diferencias microscópicas significativas en los distintos lotes de nuestro estudio señalando que la nota más característica de las preparaciones es que todas presentan abundantes células ciliadas, posiblemente exista algún grado de diferenciación en los distintos lotes de tratamiento pero no han podido ser cuantificadas. En todas las preparaciones existe presencia de secreciones y se observa la existencia de proyecciones de las células de revestimiento epitelial hacia la luz de la trompa.

#### 5.3.3.- Utero

##### 5.3.3.1.- Cuerpo del útero

En los animales pertenecientes al lote 10 no suele apare

cer edema submucoso aunque en algunos parece observarse un moderado edema. El grosor de la capa muscular está entre 0,15 y 0,20 cm.

En los animales pertenecientes al 2º lote, el edema es más manifiesto aunque por lo general, moderado. El grosor de la muscular no difiere del señalado para el lote anterior.

En los animales del lote 3º el edema de la submucosa suele ser más intenso con la presencia de arterias muy prominentes aunque en algunos animales no pase de moderado. El grosor de la muscular no difiere de lo ya señalado.

El edema de las ovejas del lote 4º, lo clasificamos de moderado en todos ellos pero el grosor de la muscular es más prominente incluso en un animal (oveja R) se alcanzan los 0,50 cm.

#### 5.3.3.2.- Cuello del útero

La nota más sobresaliente en esta parte del útero es la presencia de una moderada población de glándulas tubulares y epitelio pseudoestratificado, a medida que progresa el tratamiento las glándulas tubulares se hacen más abundantes incluso en algunos casos se observa una dilatación quística de las glándulas conteniendo moco persistiendo, en todo momento, el epitelio pseudoestratificado. No obstante hay que hacer la salvedad de que esa progresión de las glándulas tubulares no es uniforme en todos los animales pues existen excepciones pero, repetimos, por lo general hay mayor abundancia en los lotes que reciben más cantidad de progesterona. Un hallazgo significativo que se encuentra en la mayoría de los cuellos uterinos de los animales del lote 4º es la pre

sencia de metaplasia escamosa, tanto del epitelio de revestimiento glandular como del superficial.

En las distintas estructuras del aparato genital tubular, los hallazgos que hemos encontrado en los animales testigos son muy similares a las del lote 1º y al igual que se indicó al hablar del ovario no nos parece conveniente repetir estos hallazgos en cada una de las estructuras.

---

Se han practicado una serie de microfotografías de las distintas estructuras estudiadas pertenecientes a los distintos lotes. Los hallazgos encontrados en ellas los exponemos a continuación:

Microfotografía nº 1

Folículo en vías de desarrollo.

En esta microfotografía se observa el oocito, rodeado de la zona pelúcida, que aparece como un área más eosinófila que el resto. Por fuera se observan las células foliculares de citoplasmas claros, mal delimitados y núcleos redondeados con la cromatina grumosa, existiendo en algunas de ellas un nucleolo prominente. Dichas células están separadas en algunas zonas debido a la existencia de líquido folicular.

Por fuera de dicha capa observamos la teca, tanto interna como externa con su aspecto característico fibroblástico.

Microfotografía nº 2

En esta microfotografía mostramos un folículo secundario en un estadio evolutivo más avanzado, donde se observa rechazado en uno de los extremos el "*cumulus oophorus*" donde se encuentra el oocito, rodeado de sus células foliculares, que ya se describieron en la microfotografía anterior. El folículo está distendido debido a la existencia de líquido folicular relacionado con la secreción de estrógenos.

Microfotografías nº 3 y nº 4

Estas son un detalle a mayor aumento de la pared de dos de los folículos, antes descritos, donde observamos las células de la teca interna, con núcleos alargados, citoplasmas mal definidos que muestran una ligera vacuolización en gotas finas, dispuestas, por regla general, paralelamente a la membrana basal, adquiriendo el aspecto fibroblástico que las caracteriza.

Microfotografía nº 5

Corresponde a un detalle de la célula, de la teca donde se observan las características antes descritas.

Microfotografía nº 6

Esta microfotografía corresponde a la pared de un folículo de Graaf, en el que el oocito ya ha sido expulsado. Observamos como las células de la teca interna comienzan a adoptar una disposición perpendicular a la membrana basal y su citoplasma se hace más poligonal aumentando la vacuolización citoplasmática que corresponde al depósito de lípidos.

Microfotografías nº 7, nº 8 y nº 9

Estas tres microfotografía corresponden a un cuerpo luteo, observándose en la primera de ellas una clara demarcación entre las células, las cuales continúan con su aspecto fibroblástico y la teca interna, que como puede observarse se ha luteinizado, adquiriendo sus células, citoplasmas mejor definidos, poligonales, eosinófilos, con gran cantidad de lípidos y núcleo vesicular, redondeado y con un nucleolo prominente.

Microfotografías nº 10, nº 11 y nº 12

En las siguientes microfotografías, correspondientes a la trompa, observamos como el epitelio tubárico, es cilíndrico, pseudoestratificado, existiendo los dos tipos de células descritos clásicamente, células ciliadas y células secretoras, habiendo abundante secreción.

Microfotografía nº 13

Esta microfotografía corresponde a una oveja del 2º lote sacrificada a las 48 horas de la segunda inyección de progesterona, observándose una mucosa endometrial de tipo secretor, -- con glándulas flexuosas, separadas por escaso estroma y cuyo epitelio de revestimiento es de tipo cilíndrico, con vacuolas secretoras citoplasmáticas situadas en el polo luminal.

Microfotografías nº 14 y nº 15

Estas microfotografías corresponden a una mucosa endometrial de una oveja del lote 4º, observándose glándulas de luces redondeadas separadas por abundante estroma. El epitelio de reves

timiento glandular muestra pseudoestratificación nuclear, encontrándose también algunas mitosis, como corresponde a un endometrio proliferativo.

Microfotografía nº 16

Esta microfotografía corresponde a cervix uterino, donde a gran aumento observamos el epitelio cilíndrico de las glándulas endocervicales que contienen abundante moco.

#### 5.4.- CONCENTRACIONES HORMONALES POR R.I.A.

Las concentraciones de progesterona en el suero de los animales tratados así como las de aquellos que permanecieron como testigos en los distintos lotes de tratamiento, se presentan en los cuadros 1, 2, 3 y 4 que se corresponden, respectivamente con los mismos lotes de tratamiento.

En estos cuadros se incluye un sencillo estudio estadístico para conocer una serie de parámetros orientativos hacia la validez de dichos resultados.

Las gráficas I, II, III y IV recogen los mismos datos en forma gráfica para poder seguir más fácilmente las evoluciones de la concentración hormonal a lo largo del tratamiento.

En el cuadro 5 se incluyen las concentraciones medias para todos los animales, independientemente del lote de pertenencia, así como la desviación estandar de la media y demás datos estadísticos y que nos proporciona una visión de conjunto de todos los animales tratados.

Si comparamos estas cifras del cuadro 5 con las del cuadro 6 en el que se incluyen las mismas constantes para los animales testigos podremos apreciar una clara diferencia de las concentraciones de progesterona entre dichos grupos.

En la gráfica V se puede apreciar más claramente esta diferencia entre tratados y testigos.

CUADRO 1

+ Adm. de Progesterona

OVEJA	CONCENTRACION DE PROGESTERONA ng/ml - Lote 1º												
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
U	1,00	3,2											
I	0,50	2,3											
L	1,50	2,92	4,40										
N	2,52	3,05	3,42										
D	1,15	1,95	1,89	1,75									
E	1,26	2,27	3,99	3,45									
GK	0,65	0,9	0,9	0,27									
GL	1,30	0,7	0,2	0,17									

Media 1,32 2,61 3,42 2,60  
 E.S.M. 0,27 0,20 0,54 0,85  
 Varianza 0,45 0,25 1,20 1,44  
 D. ttp. 0,67 0,50 1,09 1,20



CUADRO 2. + Adm. de Progesterona

OVEJA	CONCENTRACION DE PROGESTERONA ng/ml - Lote 29													
	+	1	2	+	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
GE	0,76	2,02	2,23		1,97	5,2								
GF	1,90	3,25	3,56		2,70	6,75								
GC	2,15	2,11	3,14		2,78	5,95	3,46							
GD	0,91	2,80	3,10		3,74	5,20	3,12							
GH	1,20	2,95	4,0		2,96	3,96	2,74	2,72						
GI	1,72	3,13	4,09		2,54	2,74	2,90	1,82						
GM	0,5	0,78	1,00		1,7	2,30	2,1	2,00						
GN	0,8	1,0	1,35		1,90	2,40	2,0	1,82						

Media 1,44 2,71 3,35 2,78 4,96 3,05 2,27  
 E.S.M. 0,23 0,21 0,28 0,23 0,58 0,15 0,45  
 Varianza 0,31 0,27 0,47 0,33 2,04 0,09 0,40  
 D. tip. 0,56 0,52 0,68 0,57 1,43 0,31 0,63

OVEJA	CONCENTRACION DE PROGESTERONA ng/ml - Lote 39															
	+	0	1	2	+	3	4	5	+	6	7	8	9	10	11	12
A	2,45	2,60	3,00	2,79	4,20	1,37	2,43	3,27								
H	1,98	3,20	4,70	4,54	3,69	1,40	2,18	3,57								
J	2,15	2,20	3,45	4,55	4,32	3,05	1,97	2,31	1,11							
O	1,60	2,75	2,83	1,06	3,26	1,98	2,50	2,51	1,23							
S	1,70	3,35	3,20	2,75	2,47	2,31	2,82	2,98	3,0	2,40						
X	1,46	3,28	4,50	3,88	2,47	2,76	2,25	1,78	0,84	0,64						
GO	0,4	0,78	1,60	1,38	1,65	3,00	2,40	2,25	2,90	3,20						
GP	0,3	0,40	0,62	0,93	1,20	1,70	1,88	2,30	2,12	2,0						

Media 1,89 2,89 3,61 3,26 3,40 2,14 2,35 2,73 1,54 1,52

E.S.M 0,15 0,18 0,32 0,54 0,33 0,28 0,12 0,27 0,49 0,88

Varianza 0,13 0,20 0,63 1,80 0,66 0,48 0,08 0,43 0,96 1,54

D. típ. 0,37 0,45 0,79 1,34 0,81 0,69 0,29 0,66 0,98 1,24

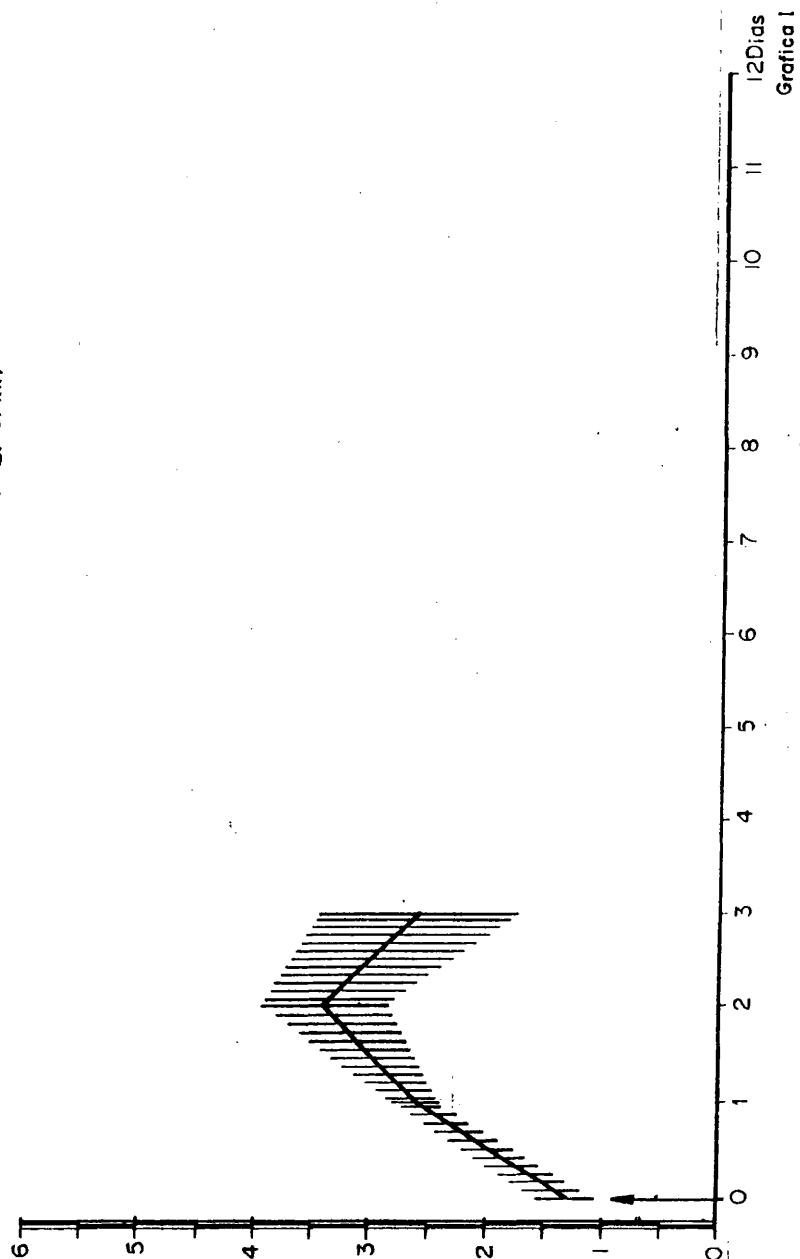
Adm.: + Progesterona - + PMSG

CUADRO 4.

CONCENTRACION DE PROGESTERONA ng/ml - Lote 49																	
	+	1	2	+	3	+	4	5	+	6	7	+	8	9	10	11	12
M	2,82	4,59	3,92	3,15	4,28	2,41	2,36	3,57	5,22	2,41	1,93						
Q	2,15	4,86	3,43	2,78	5,60	3,79	2,96	4,00	2,43	2,36	1,70						
Y	2,05	3,58	2,11	1,12	2,17	0,57	0,23	2,56	0,67	1,14	0,75						
B	1,97	4,74	3,79	3,02	4,35	3,44	2,96	2,44	1,27	0,48	0,77	0,38					
C	2,68	3,98	2,50	1,75	3,81	1,83	1,81	2,91	2,65	1,76	1,19	0,85					
F	1,94	4,00	3,44	2,90	5,10	2,17	1,37	2,49	0,73	0,39	0,24	0,10					
G	1,08	3,49	2,62	2,44	4,69	1,97	2,65	3,72	2,13	2,38	1,83	1,43	0,85				
P	0,63	2,39	1,09	0,80	3,07	1,92	1,75	2,47	2,50	2,25	1,69	1,63	1,23				
V	2,83	5,03	2,70	0,88	1,92	0,69	0,49	2,51	1,00	0,53	0,28	0,19	0,10				
R	2,59	4,62	3,78	3,14	3,69	4,23	4,37	7,30	3,33	2,41	1,37	0,80	0,37				
T	1,70	3,58	3,20	2,78	4,68	3,37	2,97	3,51	3,32	1,57	1,84	0,84	0,63				
Z	2,39	5,65	4,83	1,71	2,91	1,99	0,52	1,18	0,12	0,07	0,04	0,05	0,03				
GO	1,2	0,65	0,40	0,29	0,30	0,40	0,62	0,90	1,25	1,43	1,88	2,25	2,33				
GR	1,30	0,70	0,20	0,17	0,15	0,23	0,40	0,80	0,90	1,20	1,80	2,53	2,48				
Media	2,06	4,20	3,11	2,20	3,85	2,36	2,03	3,22	2,11	1,47	1,13	0,69	0,53				
E.S.M.	0,19	0,25	0,28	0,26	0,33	0,33	0,35	0,43	0,41	0,26	0,20	0,18	0,18				
Varianza	0,46	0,77	0,96	0,81	1,32	1,32	1,54	2,23	2,09	0,83	0,48	0,32	0,21				
D. tip.	0,68	0,87	0,98	0,90	1,14	1,14	1,24	1,49	1,44	0,91	0,69	0,56	0,46				

CONCENTRACION DE PROGESTERONA  
( $\pm$ E. S. M.)

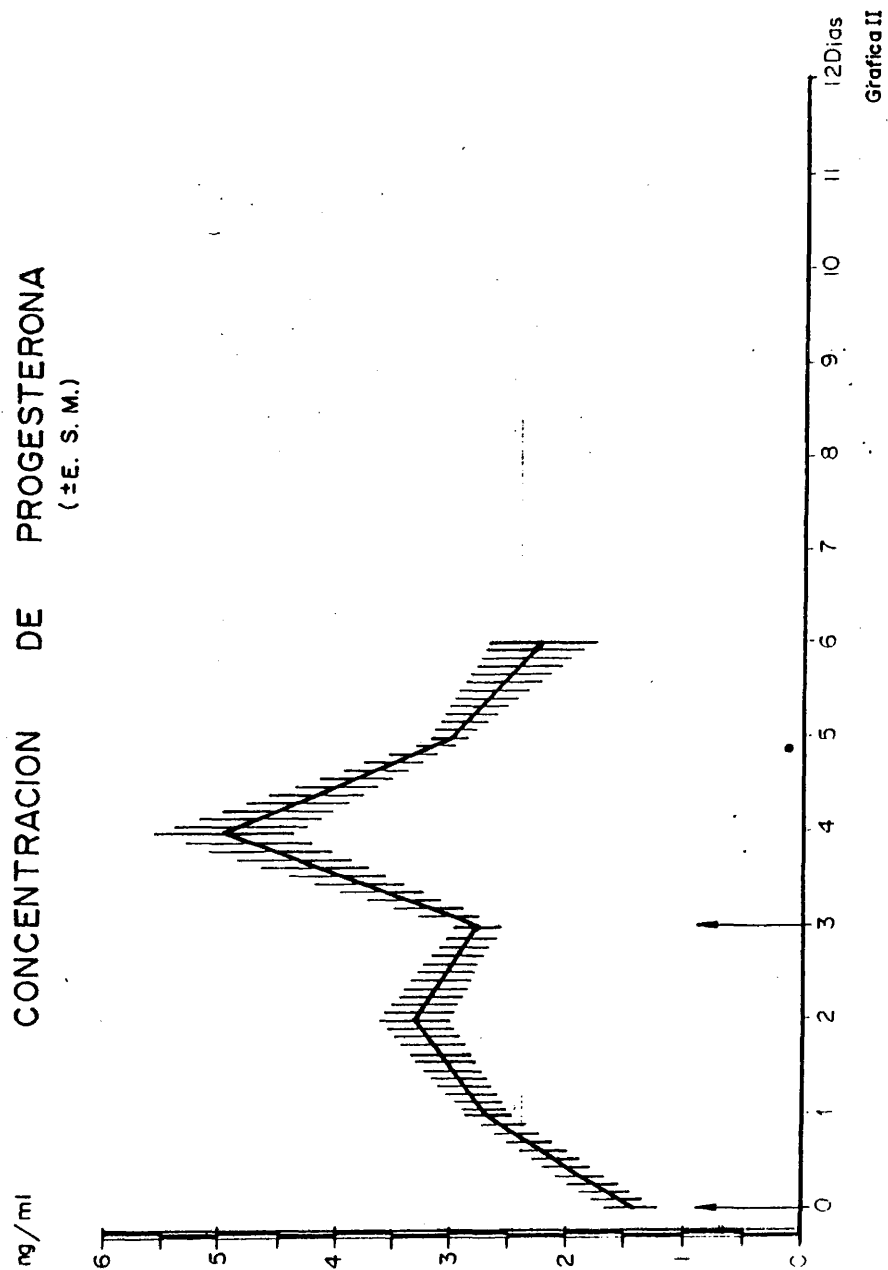
ng/ml



-219-

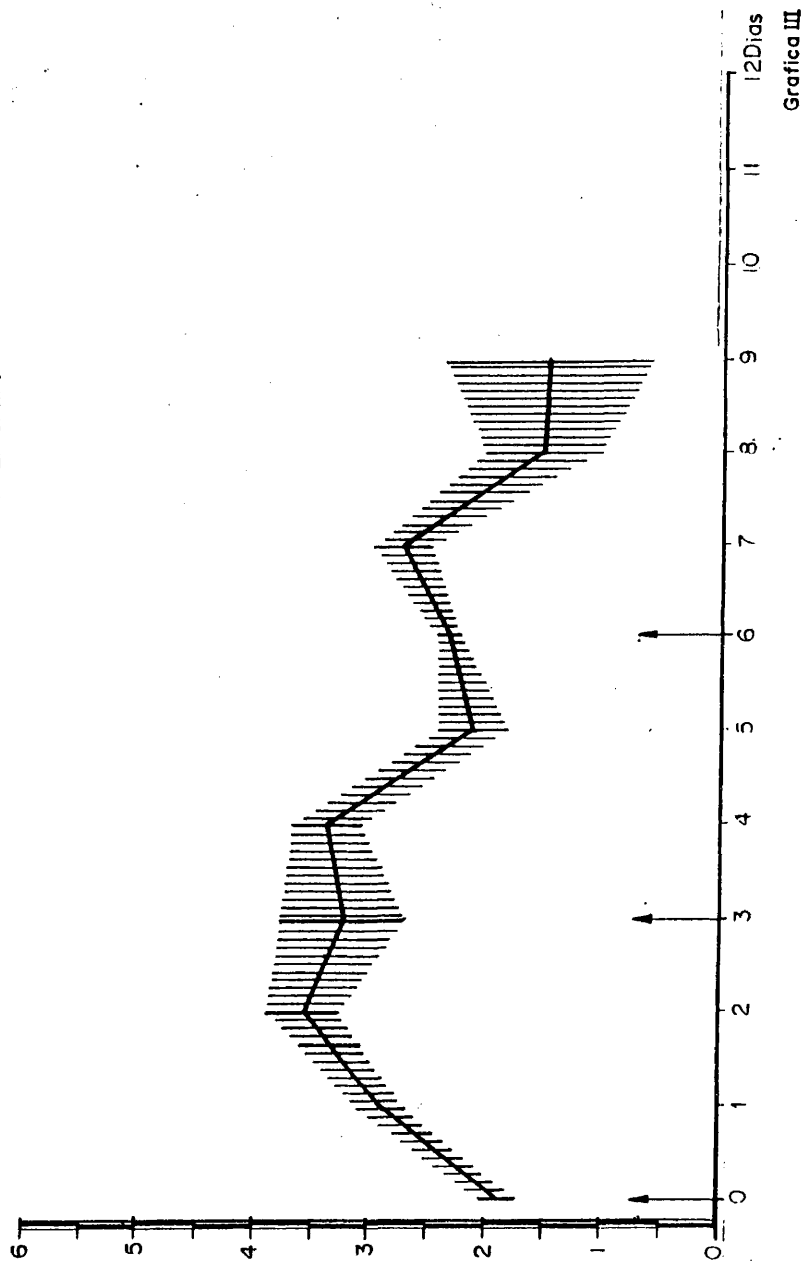
12Dias  
Grafica I

# CONCENTRACION DE PROGESTERONA ( $\pm$ E. S. M.)



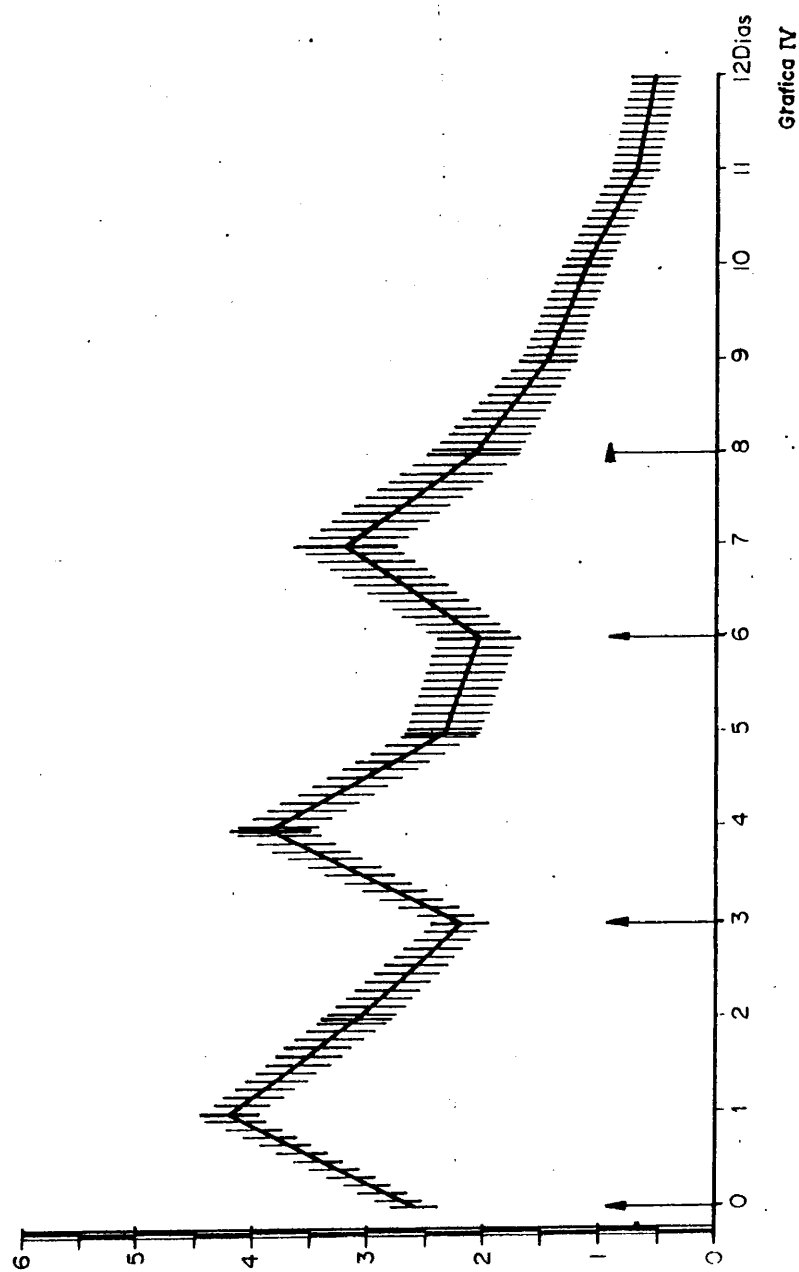
CONCENTRACION DE PROGESTERONA  
( $\pm$ E. S. M.)

ng/ml



Grafica III

CONCENTRACION DE PROGESTERONA  
( $\pm$ E. S. M.)



Grafica IV

CUADRO 5.- PARAMETROS ESTADISTICOS DE CONCENTRACIONES DE PROGESTERONA - ANIMALES TRATADOS

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
n	30	30	28	26	24	22	20	18	16	14	12	9	6
Media	1,77	3,34	3,32	2,61	4,02	2,43	2,15	3,06	1,97	1,48	1,13	0,69	0,53
E.S.M.	0,12	0,18	0,17	0,20	0,25	0,20	0,21	0,30	0,33	0,24	0,20	0,18	0,18
Varianza	0,42	0,93	0,77	1,03	1,57	0,91	0,96	1,63	1,79	0,82	0,48	0,32	0,21
D. típ.	0,65	0,97	0,88	1,01	1,25	0,95	0,98	1,27	1,33	0,90	0,69	0,56	0,46

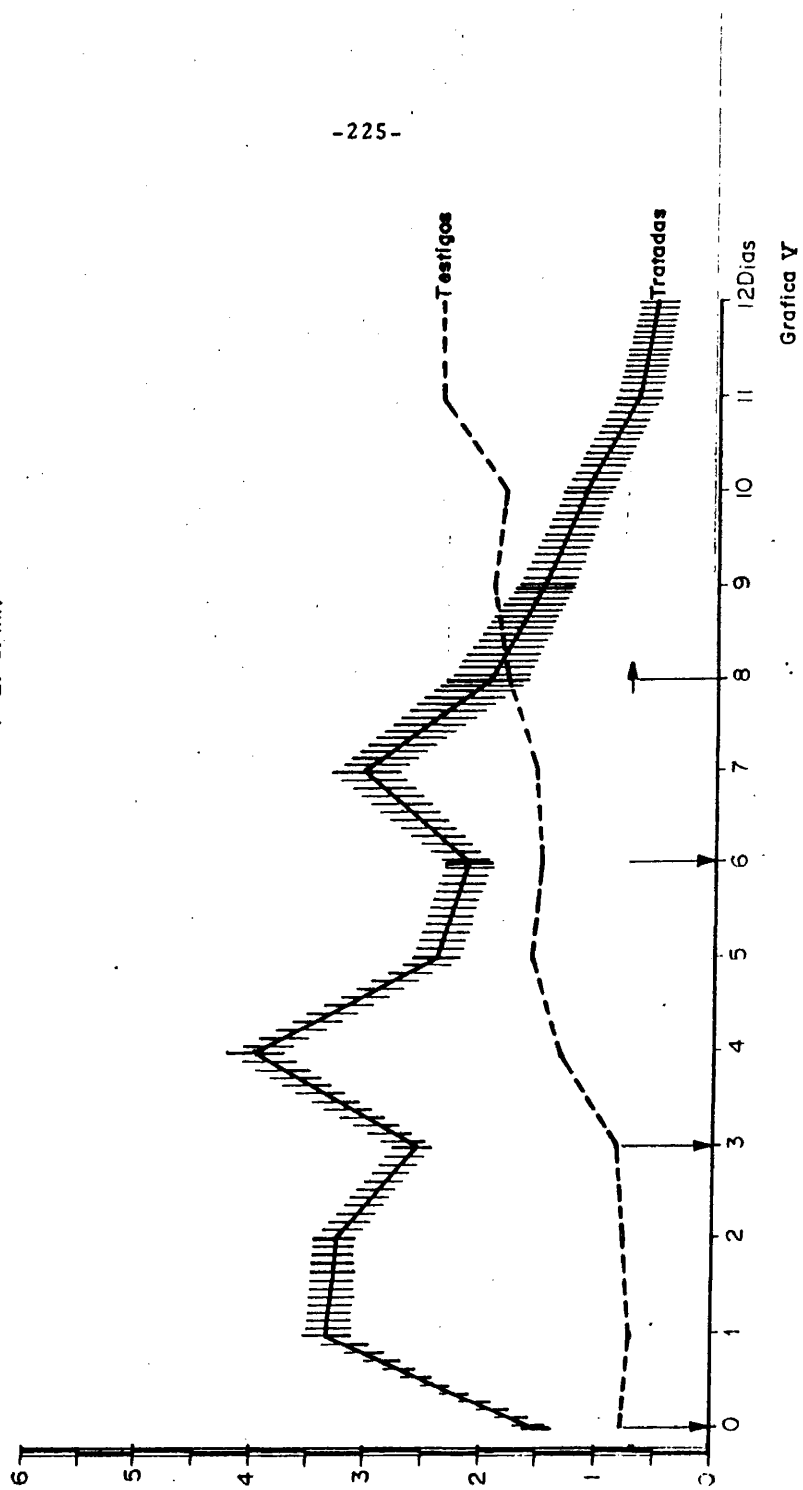


CUADRO 6.- PARAMETROS ESTADISTICOS DE CONCENTRACIONES DE PROGESTERONA - ANIMALES TESTIGOS

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
n	8	8	8	8	6	6	6	4	4	4	2	2	2
Media	0,80	0,73	0,78	0,85	1,33	1,57	1,52	1,56	1,79	1,95	1,84	2,39	2,40
E.S.M	0,14	0,06	0,18	0,25	0,39	0,43	0,33	0,41	0,44	0,44	0,04	0,14	0,07
Varianza	0,16	0,03	0,27	0,52	0,93	1,13	0,65	0,67	0,80	0,79	0,03	0,03	0,01
D. típ.	0,41	0,17	0,52	0,72	0,96	1,06	0,81	0,82	0,89	0,89	0,05	0,19	0,10

# CONCENTRACION DE PROGESTERONA ( $\pm$ E. S. M.)

ng/ml



-225-

Grafica V

226

## 6.- DISCUSSION

Antes de entrar en el capítulo de Discusión consideramos de interés hacer un comentario:

Bajo el epígrafe de Discusión incluimos no solo la discusión de nuestros resultados con los de otros autores, sino también incluimos una breve, pero precisa, discusión sobre el capítulo de material y métodos.

La verdad es que la mayor parte de los trabajos que a diario leemos en las revistas científicas se limitan a hacer una discusión de los resultados que han encontrado esos autores, es más en algunas revistas se acostumbra a poner junto, bajo el mismo epígrafe, resultados y discusión. Sin embargo, consideramos - que en un trabajo de tesis doctoral se debe discutir también el porque se ha elegido una especie de animales, y no otra, para -- llevar a cabo la experimentación, que modificaciones se han podido introducir en las técnicas empleadas para la determinación de los parámetros que se estudian, etc. en definitiva llegar a conocer toda la metódica que se haya utilizado, incluyendo el estudio crítico pertinente.

Naturalmente, que si parte de este trabajo se decide publicar habra que ajustarse a las imposiciones de los editores de la revista a la que se envíe.

Durante muchos siglos, la oveja ha sido fuente valiosa de alimentos y lana para el hombre, pero durante las últimas décadas está sirviendo también como un animal útil para el estudio de una gran variedad de fenómenos biológicos.

En efecto, la oveja es considerablemente mejor que la mayoría de los animales de laboratorio más comunes, de tal forma que a partir de la mitad de su gestación sus fetos son más grandes que otros animales de experimentación en estado adulto con lo que pueden ser fácilmente manipulados dentro del útero, y es precisamente para los estudios endocrinológicos donde el uso de la oveja como modelo experimental adquiere mayor valor hasta tal punto que COMLINE, al inaugurar el Symposium Internacional de Cardiff en 1971 dijo:

"La oveja adulta es económica de mantener y se puede criar en una gran variedad de ambientes, toleran bien la anestesia por gases y con unas medianas medidas de control se mantiene fácilmente libre de enfermedades. Su período de gestación (150 días) -- permite el poder obtener dos crías al año si se toman las medidas necesarias para sincronizar su celo".

Sin embargo, la oveja también ofrece algunas desventajas como animal de laboratorio, su lana en algunas ocasiones presenta una incomodidad de manejo, al ser un animal rumiante está expuesto a los fenómenos de timpanismo por lo que se deben tener precauciones antes de la anestesia, su genética no está tan bien definida como en otros animales de laboratorio.

Volviendo a insistir sobre la utilidad de este animal - como modelo de experimentación KITCHEN (1977) señala la importancia de su utilidad en estudios endocrinológicos y fetales algunos de los cuales incluyen las respuestas fisiológicas y mecanismos - de defensa en el nacimiento así como también los acontecimientos relacionados con la transición del ambiente intrauterino al extrauterino. Por otra parte la facilidad de la manipulación fetal ha sido básica para los estudios sobre la ontogenia del sistema inmunitario y de la hemoglobina así como de las membranas materno-fetales y de la placenta.

El cordero ha servido también como modelo para el estudio de las funciones fisiológicas durante su desarrollo fetal, estudiándose por ejemplo, la función de órganos específicos como el riñón en los distintos estadios de la gestación, estudios que son imposibles en animales de laboratorio más pequeños y, por otra parte resultaría prohibitivo por razones económicas hacerlo en primates.

Por último diremos que la oveja preñada se considera como un modelo adecuado para estudiar el papel fisiológico del lactógeno-placental humano en la regulación del metabolismo de los principios inmediatos en la madre y feto durante la gestación de la mujer.

Con estas consideraciones, creemos más que justificado el haber elegido a la oveja como modelo de nuestra experimentación independientemente de que el objetivo principal es el conocer los -

cambios morfológico-funcionales que acontecen en este animal al ser tratado por el sistema P.G. para sincronizar su celo.

Por lo que se refiere a la actividad sexual de esta especie, SIERRA ALFRANCA (1980) señala que la variación genética y la ambiental son factores decisivos en la precocidad de los ciclos sexuales y en la propia actividad sexual.

Quizá sea la especie ovina una de las más representativas de la interacción genético-ambiental. La existencia de anoestro estacionario y su mayor o menor duración e intensidad, según la raza o cruce, en función de la época y latitud son conocidas.

La comparación de razas muy anoéstricas, respecto de -- otras de actividad sexual prolongada, es muy demostrativa (THIMONIER, 1975) (citado por SIERRA ALFRANCA, 1980).

En cuanto a la fertilidad de la oveja también el complejo genético-ambiental tiene un papel preponderante, llegando en ocasiones a provocar alteraciones con una repercusión limitante en la fertilidad de las hembras domésticas y en particular en la oveja. Así desde determinados trastornos que provocan duración -- irregular del ciclo estral, en los que se ha creído detectar una cierta base genética, hasta las malformaciones congénitas en donde el substrato genético es más claro tienen influencia sobre este parámetro tan importante. No obstante, en líneas generales, la fertilidad en el caso de la oveja se ve influenciada más -- claramente por el ambiente que por la base genética, aunque, sin

embargo, tanto la consanguinidad como el cruzamiento pueden ejercer una acción negativa y positiva, respectivamente.

Como se deduce por lo expuesto en el apartado de Material y Métodos el sistema PG de sincronización consiste en la aplicación de tres dosis de progesterona (con intervalos de 72 horas) seguida de una administración de PMSG a las 48 horas de administrada la última inyección de progesterona.

Este sistema de sincronización ofrece entre otras, las siguientes ventajas, que señalaba PEREZ GARCIA en 1970 cuando daba a conocer el método, ya que este autor es el introductor de este sistema tras una gran serie de ensayos experimentales:

1. Concentración de la paridera al existir previa concentración de celos. La cubrición se realiza en dos o tres días. Esta paridera puede realizarse en fecha fija, de acuerdo con la voluntad del ganadero.

2. Obtención de dos partos al año.

3. Adelanto de la época del primer parto.

4. Obtención de dos o más corderos por oveja y parto.

5. Producción de corderos, leche o pieles en época comercialmente apropiada, concurriendo más precozmente a los mercados nacionales o internacionales.

6. Posibilidad de utilizar de una manera amplia la práctica de la inseminación artificial con sus ventajas consiguientes.

7. Obtención de una uniformidad en las crías y consi---



guiente posibilidad en la normalización de lotes.

8. Aprovechamiento al máximo de la mano de obra durante la paridera, ordeño, cuidado de las crías, etc.

9. Posibilidad única de acometer el sistema de ordeño - mecánico al estar la lactación igualmente sincronizada.

10. Aprovechamiento estacional de los pastos.

11. Disminución de la suplementación de raciones en las ovejas gestantes al acortarse extraordinariamente la temporada de gestación.

12. Disponer en un mismo período de la totalidad del producto con la revalorización consiguiente.

13. Facilitar el transporte y conservación de los productos en aquellas zonas donde estos medios sean limitados.

14. Programación de producción y manejo en el ganado ovino estabulado.

15. Hacer factible una ponderada selección de individuos destinados a la reproducción.

16. Facilitar la alimentación de los corderos cuya madre muera.

17. Obtener lotes experimentales en condiciones idénticas.

18. Disponer de hembras donadoras y receptoras o nodrizas en las experiencias de trasplante de óvulos.

Resumiendo, el sistema tiene tanta importancia que podría modificar la economía cárnica de nuestro país, así como la productora de leche ovina.

Naturalmente este sistema no es el único por lo que conviene discutir la sistemática de otros, si bien para no hacer demasiado extensa la discusión de este apartado nos limitaremos a estudiar aquellos que más han trascendido o que parezca que tienen algún futuro prometedor.

Antes de entrar en la discusión anunciada permitasenos hacer una consideración en cuanto a la época del año en que hemos realizado nuestra experimentación.

Consideramos que han quedado suficientemente claras, por lo expuesto en el capítulo de Revisión Bibliográfica, las influencias ambientales sobre el ciclo reproductor de la oveja y los mecanismos implicados en la época de reproducción y en la de anoestro.

Nuestro trabajo experimental comenzó en el otoño de 1979, concuerda así con lo dicho por BJERSING y col. (1972) quienes dicen que este tipo de ensayos se deben realizar entre los meses de octubre a enero. En este mismo sentido hablan FORTMEYER y col. (1972) e incluso estudian la incidencia de fertilidad con relación al parto anterior y afirman que los resultados negativos se producían con mayor frecuencia en las ovejas que habían parido en los últimos cuatro meses; las ovejas por nosotros utilizadas hacia más de cuatro meses que habían parido.

El ciclo estral de la oveja se puede controlar correctamente mediante la administración de progestágenos. Los animales así tratados presentan, en su mayoría, estro al poco tiempo de la administración de esas sustancias exógenas. CLARKE y Mc DONALD -- (1975) utilizan pesarios intravaginales de 40 mg de progesterona y estudian el tiempo que transcurre entre la retirada del pesario y la aparición del estro y como se modifica la incidencia de aparición del celo con la administración de PMSG y así observan como las ovejas presentan calores a los 4 días de retirado el pesario. Si inmediatamente de la retirada de éste se inyecta PMSG, ese intervalo de tiempo no se altera significativamente. Sin embargo, - lo que sí se afecta es el número de animales que presenta estro - en el sentido que el celo aparece en mayor número cuando se administra la PMSG y lo que es más significativo, hay mayor sincronización al tiempo coincidente con el segundo estro, después de retirado el pesario. Sin embargo, la cantidad de PMSG no pareció -- afectar a la incidencia de la aparición aunque no indican estos - autores, si tuvo o no repercusiones sobre el número de fetos.

A conclusiones parecidas habían llegado también EDEY y THWAITES (1966) trabajando con 430 ovejas y utilizando diversos - preparados progestágenos y distintas modalidades de tratamiento - para concluir diciendo que en algunas circunstancias puede ser ventajoso retrasar la monta hasta el segundo ciclo después de administrados los progestágenos.

Como ha quedado indicado en otro lugar uno de los objetivos de nuestro trabajo es precisamente encontrar alguna modifica-

ción estructural que explique el por qué de esa afirmación.

La supresión de la ovulación por la administración de progestágenos exógenos en opinión de SMITH y col. (1969), que confirman los hallazgos de otros autores, se debe a una inhibición de liberación de hormona luteinizante; un mecanismo similar es muy probable que cuente con la falta de desarrollo de cuerpos luteos normales cuando las concentraciones de progesterona circulan te sean altas.

Por otro lado conviene advertir que si el efecto de la progesterona es inhibir la liberación de LH, el desarrollo y función del cuerpo luteo dependen de la magnitud inicial de LH, de tal forma que si la progesterona se administra antes de que aparezca el estímulo neural que libera la LH, la progesterona evita la ovulación, pero si se administra más tarde, la ovulación ocurre pero el subsiguiente desarrollo y función del cuerpo luteo se ven afectados factores estos, que en nuestra opinión, deberán tenerse en cuenta a la hora de determinar el momento más propicio para comenzar la sincronización y que, por lo general, no se tienen en cuenta.

Desde hace muchos años se sabe que la respuesta ovárica a las hormonas exógenas, en los animales domésticos, se caracteriza por un grado excesivo de variabilidad (HAMMOND y BHATTACHARYA, 1944, citados por MOOR y col., 1980).

LEMAN y col. (1970) utilizan un sistema de sincronización que consiste en un tratamiento de 12 días con progesterona -

en forma de implantes subcutaneos con un compuesto de silicona. - El crecimiento de los folículos lo inducen mediante la inyección de PMSG en el momento de retirar el implante. De las 1251 ovejas tratadas por este sistema el 82% presentaron calores y permitieron el contacto con los machos. Este sistema, como se ve, es una variante de los muchos descritos, y algunos aquí discutidos, con el fin de inducir al estro en épocas no propicias y sincronizar el celo en la estación de cría.

Por su parte LEWIS y col. (1974a) utilizan un método de sincronizar el celo consistente en la implantación de una esponja vaginal que contiene 20 mg de acetato de fluorogestona y/o administración posterior de protescina (poliamina) y estradiol, éste último como inductor de liberación de LH.

El resultado de su trabajo es que las ovejas que solo reciben el progestágeno no exhibieron comportamiento de celo mientras que los otros grupos (Progestágeno + protescina + estradiol) presentaron celo en más del 80% tanto en ovejas secas como en lactantes.

Sin embargo BARSONS y HUNTER (citados por INSKEEP, 1974) encuentran que la sincronización del celo con progesterona no afecta ni a la duración del estro ni a su acortamiento por la presencia de machos, si bien estos autores no determinan el tiempo de ovulación en las ovejas tratadas con el progestágeno.

ROBINSON (también citado por INSKEEP, 1974) indica que la administración de progesterona seguida o no por tratamiento con

PMSG produce ovulaciones entre las 12-24 horas después de haber detectado los calores; sin embargo, el período durante el cual -- ocurre la ovulación se prolongó al menos 36 horas.

OLDHAM y col. (1980) trabajando con ovejas merinas e Ile-de-France obtienen estros en el 100% de las tratadas con progeste-rona.

LEWIS y col. (1974 a,b) ya citados, detallan perfectamen-  
te la liberación de LH con distintos regímenes de tratamiento en -  
la sincronización del celo. En el primero de los trabajos citados  
(1974a) indican que la LH permanece a nivel basal hasta 24 horas -  
después de retirar el progestágeno que incluía la esponja intrava-  
ginal pero los valores son poco elevados (2 ng/ml) aunque signifi-  
cativos. Sin embargo en los grupos de ovejas que además del pro--  
gestágeno recibieron estradiol como inductor de la liberación de  
LH se obtuvieron valores de hasta más de 20 ng/ml, ahora bien se  
observó una clara diferencia entre las ovejas secas y las lactan-  
tes en el sentido de que en estas últimas las concentraciones de  
LH aparecieron más tarde y de menor magnitud.

Otro factor que analizan LEWIS y col. (1974b) es la in-  
fluencia de la época en que se aplique el tratamiento sincroniza-  
dor con respecto a la liberación de LH. Así y con tratamientos si-  
milares de sincronización el índice mayor de estros lo obtienen -  
en el mes de noviembre (84%) siendo para septiembre, octubre y di-  
ciembre un porcentaje de 54, 40 y 58 respectivamente, sin que se  
observen variaciones significativas en los niveles de LH en los -  
diferentes meses.

Conviene señalar que dada la trascendencia que tiene en casi todos los sentidos, pero quizá más en el económico, la sincronización del celo en la oveja se han utilizado otros métodos o sistemas además de los señalados. Así Fiona HUGHES y col. (1976) utilizan en tal sentido una prostaglandina sintética (la 15 - (RS) metil - 15, 14 - dihidro.  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ) análoga a la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  y cuyo mecanismo de acción es promover la regresión lutea, iniciando así la misma secuencia de acontecimientos que tienen lugar por la luteolisis natural. Los resultados obtenidos por estos autores muestran que una simple inyección de 2 mg de ese compuesto induce a la aparición de celos fértiles cuando se administra a ovejas cíclicas - después del día 3 del ciclo. Sin embargo si se administra antes - no hay tal efectividad debido probablemente a que el cuerpo luteo no es sensible aún al efecto luteolítico de esta prostaglandina.

Por otro lado, estos autores demuestran que la dosis más efectiva es la señalada de 2 mg por animal ya que al poner el doble no apareció celo alguno, debido posiblemente a interferencias de la prostaglandina con la secreción de cantidades normales de - estrógenos y/o la normal liberación de gonadotropinas hipofisarias.

La sincronización, concepción y parto fueron más satisfactorios con una que con dos dosis del preparado.

ACRIPTOPOULOU y col. (1978) utilizan también prostaglandina sintética para inducir la ovulación en ovejas de raza Clun - Forest y llegan a la conclusión de que el cuerpo luteo de la oveja solo es sensible a esta prostaglandina entre los días 4 y 14 -

del ciclo, con lo que es preciso administrar 2 inyecciones con un intervalo de 9 días, con el fin de asegurar la respuesta de todas las ovejas, independientemente del estado del ciclo en que se encuentren.

Nos parece de interés recoger aquí los datos que obtienen estos autores después de tratar a los animales con el compuesto mencionado:

Intervalo de tiempo entre	Horas
Inyección y aparición del estro .....	38,8 $\pm$ 1,3
Aparición del estro y aparición de LH .....	6,7 $\pm$ 0,9
Aparición del estro y pico de LH .....	11,1 $\pm$ 1,1
Aparición del estro y ovulación .....	34,3 $\pm$ 0,9
Inyección y pico de LH .....	50,0 $\pm$ 1,9
Inyección y ovulación .....	73,1 $\pm$ 1,6
Pico de LH y ovulación .....	22,6 $\pm$ 0,7

TSAKALOF y col. (1977) sincronizan el celo, mediante implantes de progesterona que retiran a los 15 días, y administración de hormona folículo estimulante encontrando que el 100% de las ovejas tratadas manifiestan estros espontáneos, sin que se vea alteración significativa en cuanto a la influencia que pueda tener el nivel de nutrición sobre dicha implantación. En efecto, trabajan en dos lotes de animales de aproximadamente 100 ovejas cada uno, que se alimentan de distinta forma: un lote pasta libre



mente en las colinas griegas, mientras que el otro recibe además concentrados y, como queda dicho no parece que exista influencia entre nivel de alimentación y aparición del estro aunque sí influye sobre la posterior gestación.

Curiosamente estos autores administran una segunda inyección de FSH, 15 días después de la monta, con el fin de inducir a otro estro y mejorar la actitud reproductora, pero no encuentran ninguna efectividad con este tratamiento; sin embargo, en contra de lo que pudiera parecer no existió efecto adverso sobre la gravidez de las ovejas ya concebidas; sin duda los niveles de progesterona del anterior cuerpo amarillo minimizan los efectos de la segunda inyección de hormona folículo estimulante.

Por lo que se refiere a la administración de PMSG no cabe la menor duda que desde hace tiempo se ha desarrollado un gran interés en todo el ámbito de la explotación de ovinos, por aumentar el ritmo de la ovulación y, lo más importante, en hacer que la oveja pueda reproducirse en épocas poco propicias para ello. El método más asequible y efectivo para este fin es la administración de la hormona proteica conocida como PMSG.

Han sido varios los autores que han dedicado gran atención a la respuesta ovulatoria de esta hormona, destaca entre todos un trabajo, el de HULET y FOOTE (1969), fundamentalmente en el sentido de conocer el efecto del intervalo de tiempo entre las distintas inoculaciones tanto después de la administración de progestágenos como administrando PMSG sola.

Los resultados encontrados por estos autores son bastante discordantes si bien destaca el que encuentran un aumento altamente significativo en el ritmo de ovulación cuando se administran dos inyecciones de PMSG;; sin embargo, estos mismos autores señalan la aparición de períodos refractarios a la gonadotropina. De cualquier forma, este estudio más parece tener un carácter experimental, y como han demostrado, entre otros, PEREZ GARCIA y col. (1979) desde el punto de vista práctico lo mejor es administrar una sola inyección de PMSG a los dos días siguientes de la última de progesterona.

Según BAIRD y col. (1973) cuando el desarrollo folicular se estimula por la administración de 750 U.I. de PMSG se aumenta la secreción de androstenodiona unas diez veces; la secreción de estradiol 17 $\beta$  aumenta también notablemente, mientras que las de testosterona y estrona lo hacen a un nivel mucho más bajo.

La cantidad de PMSG administrada parece que influye notablemente sobre la duración del ciclo estral y así EASTWOOD y McDONALD (1975) encuentran que la administración de 600 U.I. acortan dicha duración de 16,16 a 15,67 días (valores medios). Cuando la dosis es de 1200 U.I. la duración media del ciclo es de 15,77 días. Por otro lado, el administrar la PMSG el día 12 del ciclo acortó también la duración del mismo (15,62 días) comparándolo con los 16,07 días que duró al administrar la hormona el día 13.

COGNIE y PELLETIER (1976), en un estudio muy documentado, analizan la aparición de estro y de la ovulación en ovejas se

cas y lactantes, tratadas con progesterona y una inyección de PMSG en estación no sexual. Estos autores comprueban que la aparición de estro fue más temprana en ovejas secas que en lactantes ( $33,9 \pm 0,98$  horas versus  $36,7 \pm 0,45$  h;  $p < 0,05$ ). Sin embargo, el intervalo entre el estro y la ovulación fue más corto en estas últimas ( $24,5$  versus  $27,5$ ;  $p < 0,05$ ). En ambos grupos las primeras ovulaciones ocurrieron a las  $62 \pm 1$  h después de la retirada del progestágeno. Pero si se compara el número de ovulaciones a las 72 y 100 después de la retirada de las esponjas, se comprueba que en ambos grupos aparecieron ovulaciones retardadas con diferencia significativa en las ovejas lactantes. Estos hallazgos explican en parte la diferencia que existe entre la edad media de los cuerpos luteos entre las ovejas lactantes y las secas ( $25,3 \pm 2,3$  h versus  $35 \pm 2$  h,  $p < 0,01$ ). Por otro lado, las concentraciones de LH fueron 25% más bajas en las lactantes que en las secas aunque esto no parece que pueda explicar las diferencias encontradas entre los dos grupos de animales utilizados.

En cuanto a la dosis de PMSG existe un criterio unánime de recomendar la dosis de 500 U.I. ya que esta cantidad es suficiente para estimular la ovulación y los índices de fertilidad y prolificidad que proporciona son muy notables. Recientemente GONZALEZ LOPEZ y col. (1980) estudian comparativamente esos índices con relación a la dosis de PMSG administrada y llegan a la conclusión de que no existe diferencia significativa cuando se administran 400, 500 ó 650 U.I. de esa gonadotropina.

Por otro lado, y según afirman GAYERIE y col. (1980) la inyección de PMSG practicada a ovejas con índices altos de prolactina aumenta la secreción de estrógenos ováricos, con lo que el mecanismo de retroalimentación positivo parece estar alterado, -- factor éste que deberá tenerse en cuenta a la hora de las aplicaciones de la gonadotropina y que, por otra parte, pueden explicar el retraso de ovulación que existe en algunos animales cuando se les sincroniza el celo durante la fase de lactancia.

LINDSAY y col. (1980) dicen que el método tradicional - de utilizar progestágenos exógenos y PMSG para sincronizar el estro no demostró ser más efectivo que el uso de progestágenos más introducción de machos en el recinto de las ovejas tratadas. En - este caso la presencia del morueco sustituye con éxito a la dosis de gonadotropina sérica. Estos autores concluyen su trabajo diciendo que en efecto existen muchas condiciones relacionadas con la - influencia que puedan tener los machos en el control artificial - del estro que por el momento se ignoran, si bien está muy claro - que en los programas de reproducción y control del estro en los - que se usen solamente las hormonas exógenas ignorando el efecto - que tiene la presencia del macho no utilizan una herramienta valiosa y potencialmente poderosa para controlar el estro.

GONZALEZ-STAGNARO y col. (1980) utilizan un método de - sincronización similar al nuestro, esto es, administración de tres dosis de 50 mg de progesterona (días 1, 4 y 7) seguido de una dosis de 500-750 unidades de gonadotropina sérica equina. Estudiando este sistema comparativamente con otros (esponjas, prostaglan-

dinas, etc.) encuentran que el llamado sistema PG proporciona un 90,2% de fertilidad y 1,63 de prolificidad cifras que son muy superiores a las encontradas con los otros tratamientos con lo que se puede afirmar, y es un dato más a añadir a la extensa literatura sobre la idoneidad del método, que en las condiciones de experimentación de estos autores el método es muy valioso.

El sistema de sincronización no solo se emplea en las explotaciones de ovino, sino que también como señalan GRANT y WARRREN (1980) es de gran utilidad con fines de crianza de la oveja para utilizarla en experimentación, pues como ya hemos señalado en otro lugar, este animal está adquiriendo cada día una mayor utilidad en el laboratorio de experimentación.

En el último Congreso Internacional de Reproducción Animal e Inseminación Artificial (Madrid, 1980), STAN presentó un sistema de sincronización del celo por corrientes eléctricas. Mediante un estimulador por él diseñado, se produce la estimulación de la región cervical del aparato reproductor con una corriente sinusoidal que influye sobre el hipotálamo, tálamo, retículo mesencefálico y zonas periféricas del acueducto de Silvio. Por los resultados que se mostraron, el sistema parece ser mejor que el estímulo hormonal. Sin embargo, el método por el momento no se ha aplicado a la oveja, sino a la vaca.

Por lo discutido hasta aquí en cuanto al sistema de sincronización hay que afirmar que el utilizado por nosotros es de los más, por no decir el más idóneo; no obstante, casi todos los

trabajos comentados, como se ha podido apreciar, enfocan la utilidad del método con fines de controlar la ovulación y la prolificidad; sin embargo, el nuestro, como ya se ha dicho reiteradamente, está encaminado a encontrar una correlación morfológico-funcional que explique algunos de los puntos que hasta ahora permanecen un poco confusos y es que en este sentido a pesar de la amplia bibliografía consultada, no existe ningún trabajo que contemple la misma finalidad que el nuestro, pero de cualquier forma los datos -- aportados aquí son de estimable valor para llegar a unas importantes conclusiones cuando se discutan los hallazgos histológicos.

Uno de los problemas que trae consigo la sincronización del celo sea cual fuere el método utilizado, es el retraso del -- tiempo en que aparece el celo y la disminución de la fertilidad. De tal forma que se obtiene un mayor índice de fertilidad en el -- 2º ciclo que en el inmediatamente posterior a la sincronización.

Estas y otras influencias son estudiadas por EASTWOOD y col. (1975) encontrando que después del progestágeno (en este caso esponjas vaginales), el índice de fertilidad era del 77% frente al 90% que encuentran en el segundo estro.

Estos mismos autores analizan la incidencia del nivel -- de nutrición sobre la aparición del celo observando que este parámetro no influye directamente y en sentido significativo sobre la aparición de los calores, aunque sí en la duración del ciclo.

En este mismo sentido se encuentran los trabajos de -- CLARKE y col. (1975) que estudian la influencia gonadotrópica so-

bre la sincronización progestágena en ovejas y observan que la administración de PMSG el mismo día de la retirada de los pesarios vaginales, no afecta significativamente a la distribución de la aparición del celo en el primer período estral. Sin embargo, la aparición del 2º estro después de la retirada del pesario, ocurrió después de un período significativamente mayor si las ovejas habían recibido la PMSG inmediatamente después de la retirada del progestágeno. Este efecto fue más significativo aún durante el tercer período estral.

En cuanto a la fertilidad se refiere son muchos los factores que pueden afectarla, no vamos a señalar aquí todos por cuanto en realidad sería excesiva la lista de ellos pero no queremos dejar de citar a algunos que por unas u otras razones indican factores que no son de los más usuales. ADAMS y col. (1979) señalan la incidencia que sobre la fertilidad presenta el que las ovejas hayan o no pastado en campos estrogénicos y así indican que las ovejas que pastan durante períodos prolongados en campos estrogénicos sufren una considerable reducción de la fertilidad, que puede incluso persistir durante varios años después de haber sido retiradas de esos pastos. Esta infertilidad se debe fundamentalmente a que el transporte de los espermatozoides por el cervix se encuentra alterado y a la aparición de mucus en esa misma región. No obstante en las ovejas que se nutren con tales pastos se observó un gran número de folículos en sus ovarios, posiblemente debido a un aumento del desarrollo folicular que, por otra parte, puede ser el responsable de la disminución de folículos primordiales. De --

cualquier forma estos autores dicen que existe una correlación inversa entre el número de folículos primordiales en el ovario y el ritmo de ovulación, factor éste a tener en cuenta dado que en algunos sistemas de sincronización de celo puede que esto también - ocurra, si bien en la literatura utilizada no hemos encontrado nada de ello.

En este mismo sentido se pronuncia HARESING (1975) que encuentra una gran diferencia, en lo que al anoestro estacional - se refiere, entre ovejas que pastan en las colinas y aquellas que lo hacen en las llanuras, siendo mayor el anoestro en las primeras que en las otras; sin embargo, en este trabajo no se analizan los pastos ni se indica si esa diferencia es atribuible al eje hipotálamo-hipófisis o a la propia gónada.

SMITH (1971) señala que el tratamiento de ovejas con progesterona hace aumentar la secreción de mucus en el aparato genital. Este hallazgo es confirmado por REXROAD y col. (1977) y nosotros hemos podido apreciar cualitativamente que los grupos 3 y 4 presentaban mayor cantidad de moco que los otros. La presencia de esta mucosidad puede ir en contra del índice de fertilidad por -- cuanto puede disminuir el flujo de esperma por el cervix.

DUCKER y col. (1974) utilizan la citología vaginal para determinar el momento de la ovulación, confirmando los resultados de la citología por laparotomías exploratorias. La indicación definitiva de la ovulación es considerada cuando en una serie de -- preparaciones no aparecen células cornificadas, seguidas de otra



serie con la presencia de estas células o bien cuando apareció un cambio significativo en la proporción de células cornificadas y la presencia de otros tipos celulares, aunque todas las extensiones contengan células cornificadas.

Precisamente fue un criterio similar al que nosotros -- utilizamos para comenzar los tratamientos con progesterona, ya hemos dicho que realizamos extensiones a diario, con su correspondiente tinción, y que el tratamiento con progesterona comenzó en la época del diestro, siendo precisamente la nueva aparición de las proporciones de células cornificadas la que parecía como más demostrativa de que los animales se encontraban en esta fase del ciclo estral. De cualquier forma, al igual que DUCKER y col.(1974) entendemos que éste no es un método definitivo, existe un gran -- error quizá mayor para el caso de estos autores que lo que pretenden es detectar la ovulación, mientras que para nosotros era el diestro. Ahora bien en nuestro caso y como más adelante veremos, la presencia en los ovarios de grandes folículos puede que haya sido la fuente de error de que muchos animales no comenzaran sincrónicamente el tratamiento hormonal pero es que no existe otra forma para poder determinar esa fase del ciclo sexual de la oveja. Decimos que los grandes folículos puede enmascarar la predicción del estadio y es que en efecto, esos folículos son capaces de mantener un modelo cíclico de secreción de estrógenos que en definitiva va a modificar la citología vaginal y confundir en la apreciación para determinar el período del ciclo en que se encuentra el animal.

En cuanto al epitelio vaginal ha sido un problema clásico el dilucidar su verdadero origen. Por una parte, algunos investigadores han sugerido que el epitelio vaginal procede en su totalidad del seno urogenital, mientras que otros indican que las tres quintas partes craneales derivan del epitelio Mulleriano y el resto del seno urogenital (CUNHA, 1975).

En líneas generales, la técnica por nosotros utilizada para recoger las muestras vaginales es la misma que la descrita por REXROAD y col. (1977).

Como ha quedado señalado en el apartado de Material y Métodos (vease 4.3.2) se decidió la perfusión de alguno de los ovarios de las ovejas utilizadas en la experimentación, por cuanto siguiendo los consejos de varios autores, entre ellos BJERSING (1972), es conveniente esta perfusión del ovario para poder analizar mejor sus estructuras. Atendiendo a estas directrices practicamos unas 300 perfusiones en el propio matadero de Giresa, antes de realizarlas en los ovarios de nuestros animales tratados. Esa perfusión se practicó inmediatamente del sacrificio, disponiendo en aquel caso de una solución coloreada con el fin de poder conocer a que partes del aparato genital alcanzaba la perfusión.

Gracias al entrenamiento y práctica adquirida con estos animales nos fue posible practicarla, con total éxito, en los animales de nuestra experimentación.

En el apartado 3.6.1 de la Revisión Bibliográfica ha quedado expuesta la polémica en cuanto a la irrigación del aparato

reproductor de la oveja, polémica que se basa fundamentalmente para tratar de explicar el posible paso de sustancias luteolíticas desde el útero hasta el ovario. Pues bien según CAMPO y col.(1973) la arteria uterina y la arteria vaginal de cada lado se originan a partir de la arteria iliaca interna. Las arterias ováricas parten de la aorta cranealmente al origen de las arterias iliacas externas.

La vena útero-ovárica (vena ovárica) de cada lado termina en la vena cava aproximadamente al nivel del origen de las arterias ováricas.

La arteria ovárica sigue el curso de la vena útero-ovárica y está muy unida a la vena en toda su longitud. Esta aposición es muy importante para el paso de la sustancia luteolítica desde la vena a la arteria.

La vena útero-óvarica drena la mayor parte del cuerno, el ovario y la trompa. Esta vena junto con sus tres ramas (uterina, ovárica y tubal) y la arteria ovárica también con sus respectivas ramas forman un pedículo vascular en el ligamento ancho. La arteria ovárica pasa ventrocaudal desde la aorta y la rama ovárica (muy convoluta) de la arteria del mismo nombre, pasa ventralmente hacia el ovario. La rama uterina de la vena útero-ovárica pasa dorsocaudalmente a las convoluciones de la arteria estando muy apuesta a ellas. La vena útero-ovárica pasa craneo-dorsal hacia la vena cava junto al borde craneal del pliegue dorsal del ligamento ancho. La sangre venosa en el pedículo vascular del cuerno

uterino y del ovario va en dirección dorsal, en contra de la gravedad.

La vena útero-ovárica contiene 4 ó 5 válvulas prominentes espaciadas entre 10 y 25 mm. Las válvulas que están junto a la cava parecen estar más juntas. También existen válvulas en las porciones terminales de las ramas ovárica y tubal y en casi la mayor parte de la rama uterina y en partes de las grandes tributarias de la rama uterina. Como la sangre venosa se mueve dorsalmente, contra la gravedad, las válvulas juegan un papel muy importante en el flujo de la sangre venosa, en el sentido de que es un flujo lento, favorece el paso de la sustancia luteolítica de la vena a la arteria dado el estancamiento temporal que se produce en las venas y al que también contribuye notablemente la presencia de las indicadas válvulas.

El drenaje venoso del ovario y la trompa es bastante complejo, la rama ovárica de la rama útero-ovárica termina en la rama tubal en unos casos y en otros lo hace en la rama uterina. La citada rama ovárica es muy diferente de unos animales a otros, en unos es rama principal del ovario mientras que en otros es muy corta y formada por dos o más tributarias del ovario. Al menos una de las principales venas del ovario pasa a través de convoluciones de la rama ovárica de la arteria ovárica. La rama que pase a través de esas convoluciones presenta muchos canales colaterales. Esta disposición morfológica deberá ser tomada en cuenta cuando se quiera recoger muestras de sangre procedente del ovario o al hacer las determinaciones de flujo venoso.

El drenaje venoso de la trompa también es bastante complejo y en parte se encuentra solapado con el del ovario. Las venas principales de la trompa parecen formar un arco alrededor del ovario, de tal forma que una rama del arco entra en la vena uterina principal (rama uterina de la vena útero-ovárica) y la otra rama entra en la vena útero-ovárica o se une a la rama ovárica de la vena útero-ovárica. La rama craneal del arco drena la porción de la trompa uterina y la rama caudal parece que es la encargada de drenar las porciones media y caudal. Además, una vena prominente conecta el arco venoso con una vena de la punta del cuerno uterino. No está clara la dirección del flujo venoso en esta complicada red venosa.

Se piensa que la rama uterina es la principal encargada del drenaje de este órgano pero existe otra vena (la vena vaginal) que se origina a nivel del cervix y la vejiga de la orina, que recibe ramas de estas estructuras formando anastomosis prominentes con el complejo sistema venoso de la superficie ventral del útero. La vena vaginal pasa a través del ligamento ancho en íntima asociación con el ureter y la arteria vaginal. La vena vaginal contiene a unas cuantas válvulas y en algunos casos se ha visto que vacía en la vena útero-ovárica inmediatamente antes de la terminación de la vena útero-ovárica en la vena cava.

Por lo que se refiere a la red arterial, las tres ramas (uterina, ovárica y tubal) de la arteria ovárica son muy tortuosas y se encuentran en estrecha aposición a las correspondientes venas. La rama ovárica es muy convoluta siendo muy variables las convolu-

ciones de unos animales a otros. La porción convoluta de la rama ovárica de la arteria de ese nombre tiene una longitud de unos 5 cm. La longitud de la arteria es de alrededor de 30 cm. La rama ovárica de la arteria en unos animales es la rama principal mientras que en otros hay dos ramas prominentes. Por otro lado existen arterias colaterales pequeñas al ovario que se originan como ramas de las arterias tubales.

Las convoluciones de la rama ovárica se extienden hasta la porción medular del ovario.

La distribución del aporte arterial a la trompa uterina es similar a las venas del mismo nombre. La porción craneal de la trompa está irrigada por la rama tubal de la arteria ovárica y la porción caudal está irrigada por una rama de la rama uterina de la arteria ovárica. Existen anastomosis entre los sistemas arterial, tubal y uterino.

Según han demostrado LADNER y col. (1970) la circulación uterina de la oveja, esté vacía o grávida, no depende de una autorregulación como sucede en otras áreas orgánicas (cerebro, riñón, etc.) sino más bien de la propia presión de perfusión, de ahí que haya, en algunos casos, una desigualdad de aporte sanguíneo, al menos cualitativamente.

De los aproximadamente 300 ovarios que nosotros perfundimos, solo logramos hacerlo con éxito en los últimos cincuenta, primero porque se precisaba de una gran pericia para realizarlo, tengase en cuenta que era la primera vez que intentábamos realizar es

ta técnica; también los fracasos eran debidos a que no todos los autores (como ha quedado indicado en la parte de revisión bibliográfica) están de acuerdo con las rutas que siguen las arterias y venas que irrigan o drenan estas porciones del aparato genital de la oveja. Tuvimos necesidad de resolver una gran problemática que queremos apuntar aquí, cuanto menos sea por la gran cantidad de tiempo que nos llevó la práctica de esta técnica y, por supuesto, por la gran experiencia que de ello obtuvimos.

Pues bien, el primer problema con que nos encontramos era que esa arteria uterina no se encontraba, primero con el mismo calibre y segundo en la misma disposición en los distintos animales, pues en algunos animales se trataba de una arteria simple, en otros alcanzaba hasta el tercio superior del cuerpo uterino y ahí se bifurcaba en dos ramas. En otros casos había más o menos a la misma altura varias ramificaciones.

Suponíamos que ésto tenía que guardar relación con: estado del ciclo, edad del animal y número de gestaciones habidas.

El resultado que obteníamos inyectando en esa arteria era que se nos coloreaba el cuerpo uterino, los capilares y vasos del ligamento ancho, pero se daba el caso curioso de que el colorante discurría por los lugares anteriormente indicados, y el ovario quedaba perfectamente aislado de la penetración del colorante tanto exterior como interiormente.

Por lo tanto no conformes con los resultados que obtenía

mos, consideramos las orientaciones proporcionadas por NICKEL y - col. (1976) que describen más correctamente la arteria ovárica y sus relaciones anatómicas.

Sin embargo, esta ubicación no es tan exacta y permanente por posibles causas: edad, estado del ciclo, etc., además del calibre de la misma que en algunos casos no era ni visible. En los casos en que pudimos observarla y cateterizarla en su parte más - próxima al mesovario observamos:

a) Ovarios en fase de maduración folicular

El tejido ovárico no oponía ningún tipo de resistencia a la perfusión. El líquido se difundía perfectamente por toda la superficie ovárica, y con gran rapidez. Observamos que cuando inyectabamos el líquido con mayor presión de la normal se podía romper algún folículo, generalmente el que se encontraba en un estado de maduración más avanzado, y precisamente en estos casos el líquido salía por el folículo que se había roto, pero no salía la misma - cantidad que inyectamos; lo cual demostraba que parte del líquido se difundía.

b) Ovarios con folículos dehiscentes

Este caso es prácticamente semejante al anterior, con - la ventaja de que aún se difundía con mayor rapidez y donde más - pronto notábamos la difusión del colorante era precisamente en el folículo de Graaf que rápidamente se coloreaba, después se difun- día por el resto del parénquima ovárico.

Cuando nos encontrábamos con ovarios con algún folículo



de Graaf, debíamos tener más precaución al inyectar la sustancia colorante, pues al aumentar un poco la presión al inyectar se rompía el folículo; lo mismo ocurría, si inyectábamos la misma cantidad de líquido pero más deprisa.

c) Ovarios con cuerpos hemorrágicos

En estos casos el líquido se difundía peor que en los casos anteriores, pero en general se difundía bastante bien.

Observamos que precisamente el cuerpo hemorrágico era de las primeras estructuras en tñirse pero la difusión al resto del parénquima ovárico es más lenta que en los casos anteriores y no tan correcta.

d) Ovarios con cuerpos luteos

En este caso fue donde más dificultades encontramos para perfundir y donde peor se difundía el colorante.

Además observamos que hay siempre una zona situada inmediatamente adyacente al cuerpo luteo y un poco desplazada hacia la superficie ovárica, a la cual parece no llegar el colorante.

Se decidió que lo mejor sería perfundir ambos ovarios de una de las dos ovejas que constituirían los subgrupos de cada lote de tratamiento. Esta decisión se debe al hecho conocido que en prácticamente todas las hembras, sean de la especie que quieran, un ovario es más activo que otro, incluso un ovario es activo y el otro no. De esta forma si solo perfundieramos un ovario de cada animal nos exponíamos a que hubiera coincidencias entre los dos

animales en el sentido de que a lo mejor se perfundían los ovarios no activos, o los inactivos o uno de cada. Con la decisión tomada se soslayó este inconveniente.

El líquido de perfusión utilizado por nosotros es el recomendado por BJERSING y col. (1972) y cuya composición ha quedado detallada en el capítulo de material y métodos. Este mismo líquido es también utilizado por ADAMS (1977) cuando analiza los cambios de estructura que produce el pastoreo en zonas estrogénicas sobre distintos órganos del aparato reproductor ovino.

Aún cuando en nuestro trabajo no hayamos medido el flujo de sangre del ovario es interesante que anotemos los resultados encontrados por MOORE y col. (1969) que indican encontrar una notable variación de flujo entre los distintos animales que usaron en su experimentación, señalan como valores medios los de  $3,2 \pm 0,2$  ml/min., sin que observen variaciones de flujo en las distintas fases del ciclo estral de la oveja, así como tampoco encuentran diferencias de flujo en ovarios que contengan un cuerpo luteo secretor y aquellos que no contenían estructuras activas (3,2 y 3,1 respectivamente). Sin embargo, estos valores no están en consonancia con los dados por MOOR y col. (1976) quienes indican, revisando los de otros autores, que el flujo desciende notablemente unas 72 horas antes de la ovulación, según se indicó en la revisión bibliográfica.

En cuanto a la distribución del flujo capilar a los folículos de distinto tamaño, estos últimos autores afirman: a) el

flujo parece que sea inversamente proporcional a la masa de tejido folicular, y b) el aumento de flujo folicular se aprecia en todas las clases de folículos. Sin embargo, el folículo destinado a ovular recibe más cantidad de sangre, en términos absolutos (ml/min) y además los capilares son más permeables que los de otros folículos. Sin duda los altos niveles de estrógenos y de LH que se encuentran en el período próximo a la ovulación juegan un importante papel en el aumento de este aporte sanguíneo.

Aún cuando la significación del aumento de flujo a los folículos de los ovinos, antes de la ovulación, no está muy clara, parece ser que la rápida respuesta de la microcirculación ovárica a la LH y el aumento de las necesidades metabólicas de los folículos tras el estímulo gonadotrópico sugieren que el cambio de vascularidad puede ser una parte concomitante de la acción de la LH sobre el propio folículo.

HARESING (1975) estudia la respuesta ovárica a la hormona liberadora de la LH en ovejas anoéstricas, utilizando un método similar al que hemos empleado nosotros, para la obtención de muestras del aparato reproductor de la oveja; de esta forma obtienen cortes de ovario de 1 mm de gruesos, conteniendo todos los folículos y clasificándolos según el grosor de los mismos, los mayores de 3 mm se procesaron y embebieron en parafina haciendo luego cortes de 6  $\mu$  y teñidos por hematoxilina - eosina con el fin de determinar los signos de atresia folicular.

De los estudios de estos autores se llega a la conclusión de que el tratamiento con LH-RH es significativo el aumento

de folículos mayores de 4 mm. Se sugiere asimismo que la administración de hormona liberadora de LH produce suficiente cantidad de gonadotropina para inducir el desarrollo folicular. Sin embargo, como quiera que la orden de esa hormona hipotalámica induce a la liberación de LH y FSH no se puede saber si el desarrollo folicular resultante de dicha administración se debe a la acción sinérgica de las dos gonadotropinas hipofisarias o solo a la FSH.

Aún cuando algunos autores son partidarios de la recogida de muestras del aparato genital de la oveja mediante anestesia nosotros no la hemos utilizado porque algunos anestésicos, entre los que se puede encontrar el pentobarbital sódico, pueden inhibir la liberación de LH inducida por estradiol, sobre todo si esa anestesia se administra inmediatamente antes de la elevación de la LH (RADFORD y WALLACE, 1974).

Como quiera que la secuencia de las técnicas utilizadas en nuestra experimentación es muy precisa, hemos pensado, basándonos en las afirmaciones de esos autores, que la anestesia pudiera alterar en parte nuestros resultados, por ello hemos preferido el sacrificio directo y recogida inmediata de muestras.

En el apartado 5.2.1 han quedado detallados los resultados que hemos encontrado en nuestros animales de experimentación referentes al número de folículos, tamaño de los mismos, presencia de cuerpos luteos, etc. bueno será que discutamos ahora algo referente a este tema.

El desarrollo de los folículos y la fertilidad han sido motivo de polémica durante años e incluso actualmente no hay conclusiones claras a este respecto, parte de ello ha sido ya tratado en este mismo capítulo de discusión.

Lo que no cabe duda es que nuestros lotes de tratamiento presentan todos una gran cantidad de folículos quísticos en los ovarios con diferencias notorias entre unos y otros lotes en el sentido de que los animales que reciben mayor cantidad de progesterona presentan mayor número de folículos. Precisamente ésta pueda ser una de las posibles explicaciones de la disminución de fertilidad de las ovejas con celo sincronizado, en el ciclo siguiente a la sincronización. En efecto, la utilización de progestágenos y progesterona como sincronizadores de celo, en otras especies, ha demostrado tener el efecto secundario de disminuir el ritmo de fertilidad y aumentar el número de folículos quísticos. En definitiva, lo que creemos que ocurre es que la administración de progesterona altera el equilibrio esteroideo de la hembra, -- equilibrio que debe de ser óptimo en el momento de la ovulación para la subsiguiente fertilización pues no olvidemos que ese mencionado equilibrio esteroideo es de capital importancia tanto para el transporte del óvulo hasta el lugar de la fecundación como para crear en el útero el ambiente adecuado para su posterior desarrollo en caso de haber sido fertilizado.

La explicación de que aparezcan esos folículos quísticos en los animales tratados la encontramos en que el tratamiento progesteronico va a alterar o inhibir por completo la libera-

ción de gonadotropinas durante el tratamiento, si bien parece ser que éstas aplicaciones de progesterona solamente inhiben las grandes cantidades de gonadotropinas (ésto es liberación de tipo oleada) pero permiten que continúe la liberación episódica de ellas - (al igual que sucede en la fase lútea del ciclo normal); de ahí - que el crecimiento folicular continúe, aunque muy lentamente, durante la fase de inhibición estral. En definitiva el desarrollo folicular continúa más allá del tamaño normal ovulatorio y ocasionalmente el folículo se enquista. Pensamos que esta es la explicación más fisiológica de por qué las ovejas tratadas con sincronizadores del celo no presentan un índice de fertilidad óptima en el celo siguiente a la sincronización. Se nos puede decir, y con razón, que por qué muchos animales quedan gestantes después de la sincronización como en efecto sucede; la explicación no es -- otra que como quiera que estos mecanismos de control son muy sensibles (estudiese todo lo dicho en la parte de revisión sobre los mecanismos de retroalimentación a nivel hipotálamo-hipófisis) se hace muy difícil que en una población ganadera relativamente grande, todos los animales hayan de comportarse de igual forma. Por otro lado la aplicación de las sustancias sincronizadoras se hace indiscriminadamente de la situación cíclica del animal ya que, -- por supuesto, carecería de valor el método si tuviera que aplicarse en una determinada fase del ciclo, pero de cualquier forma son factores que habrá que tener en cuenta a la hora de evaluar el método.

Nuestros resultados son similares a los de CASIDA y col. (1966), aunque habría que pensar también en la influencia de los -

progestágenos que se han administrado y de cualquier forma, el número de animales que hemos utilizado no es demasiado grande como para hacer un estudio estadístico.

Segun han demostrado DENAMUR y KANN (1973) los cuerpos luteos pueden prolongarse si se administra estradiol en los primeros dos tercios del ciclo de la oveja siempre y cuando esté presente el útero, ya que en los animales histerectomizados esto no ocurre. Ahora bien, la dosis de estrógenos es muy importante ya que cuando ésta se aumenta se observa una regresión prematura del cuerpo luteo.

Los cuerpos luteos sobre un ovario pueden modificar los modelos de crecimiento y atresia de los folículos del mismo ovario. En las ovejas particularmente, el ovario que contiene el cuerpo luteo presenta un desarrollo folicular mayor que el ovario que no presente cuerpos luteos. Por otro lado, el ovario que contiene mayor número de cuerpos luteos presenta menos folículos atrésicos. Estas asociaciones positivas disminuyen durante la fase folicular de ciclo estral (REXROARD y CASIDA, 1975).

El tipo de células predominantes en el cuerpo luteo de la oveja es la llamada célula lutea, poliédrica, con un diámetro de 30  $\mu$ m (GEMMELL y col., 1976).

McCLELLAN y col. (1977) hacen un estudio muy detallado de los cambios morfológicos y bioquímicos durante la regresión del cuerpo luteo en ovejas y encuentran que los cambios de los cuerpos luteos son muy manifiestos entre los días 15-17 del ciclo.

En las células granulosas luteínicas se observa gran cantidad de: gotas lipídicas, cuerpos densos grandes y cuerpos multivesiculares. Los capilares se observan constriñidos o llenos de restos celulares. El intersticio es más ancho conteniendo también numerosos restos celulares y numerosos eosinófilos así como algunas células fagocíticas presumiblemente macrófagos inmaduros.

El uso de prostaglandina ha demostrado ser una valiosa herramienta para inducir la secuencia de sucesos líticos que conducen a la regresión del cuerpo luteo, ya que la respuesta obtenida es fácilmente repetible en un período breve de tiempo. Los estudios de McCLELLAN y col. (1977) y otros autores a este respecto son concluyentes pudiéndose afirmar que la regresión lutea es el resultado de una pérdida de los procesos de regulación específica dentro de las células luteínicas lo que causa una parada inmediata de la secreción de progesterona. El cuerpo luteo de la oveja presenta una serie de sucesos genómicos que es común a la muerte celular de una gran variedad de sistemas de renovación en organismos Eucariotas.

Por lo que a tamaños de folículos se refiere y como ha quedado señalado en nuestros resultados hay una gran dispersión entre los medidos. Sin duda las influencias genéticas y/o hormonales son notorias. Sin embargo, y de acuerdo con lo afirmado -- por CAHILL y col. (1979) no existe una evidencia clara de los mecanismos que determinan el ritmo de ovulación en la oveja. Estos autores indican tras un estudio no demasiado extenso, utilizando



dos razas distintas de ovejas, que el ritmo más alto de ovulación se debe al mayor número de folículos grandes, disponibles para ser estimulados a que ovulen.

WHEELER (1978) compara la actividad ovulatoria y esteroideogénica del ovario izquierdo y derecho en la oveja sin que parezca existir una diferencia significativa en cuanto a mayor actividad de uno de los dos ovarios, aunque sí existe significación en cuanto a mayor aparición de cuerpos luteos simples que múltiples tanto para ciclos consecutivos como alternantes, manteniéndose casi por igual esta relación en las tres razas estudiadas por este autor.

Nuestros hallazgos están en consonancia con esos resultados en toda su extensión como ya hemos apuntado en el capítulo correspondiente.

Se puede concluir de esos estudios de WHEELER (1978) y de nuestros hallazgos que el lado de preferencia ovulatoria para la oveja es independiente de la localización del CL del ciclo ovárico precedente y que la duración de los ciclos no está influenciada por la localización de los cuerpos luteos.

La ruptura del folículo ovárico es uno de los acontecimientos más importantes dentro del ciclo estral de cualquier hembra y su detección ha sido motivo de numerosas investigaciones algunas de las cuales hemos recogido en nuestra revisión bibliográfica (vease apartado 3.5.- Ovulación).

En todo programa de estudio del ciclo reproductor parece inexcusable el conocer y precisar los signos o señales que caracterizan dicho momento.

En nuestro caso el determinar el momento de la ovulación ha quedado relegado a un segundo plano por cuanto el estudio secuencial de los órganos que integran todo el aparato reproductor de la oveja va a ser decisivo para conocer el momento de la ruptura folicular. Sin embargo, y aunque solo sea a título de curiosidad nos interesa reseñar aquí los estudios de BENOIT y col. (1976) que utilizan un aparato al que denominan cámara intra abdominal para la observación a largo plazo del ovario de la oveja. Dicha cámara está construida con cloruro de polivinilo resistente. Esta cámara, se implanta quirúrgicamente y tras un período de recuperación del animal, éste se conduce como si no llevara esta prótesis. Con esta cámara, según los autores, se hace posible la observación continua del ovario de la oveja durante períodos mayores que los que dura el ciclo estral y se puede conocer con exactitud el momento de la ovulación y correlacionar la sintomatología comportamental con ese momento.

Como ha quedado expuesto en su correspondiente lugar -- (5.3.1) en todos los lotes de tratamiento se han encontrado folículos atrésicos en distintos estadios, estadios que fueron clarificados maravillosamente por HAY y col. (1976) y que nosotros hemos podido comprobar en nuestras preparaciones aunque no con detalles ultraestructurales. La atresia folicular ha sido también minuciosamente estudiada por O'SHEA y col. (1978b).

Queremos dejar constancia de la diferencia que hemos encontrado entre las distintas preparaciones de ovario en el sentido de que aquellas, correspondientes a los ovarios perfundidos -- con el líquido que se indicó, son mucho más claras que las no perfundidas, efectivamente el arrastre de elementos sanguíneos e incluso de restos celulares proporciona una mayor nitidez a la preparación.

En el apartado 5.3.2 y siguiente se han detallado los resultados de nuestros hallazgos histológicos en cada uno de los órganos que integran el aparato reproductor de la oveja. Estos - resultados son imposibles de discutir en profundidad con los de otros autores por cuanto, como ya ha quedado señalado en más de una ocasión, el protocolo de experimentación seguido por nosotros ha sido muy particular, no hemos encontrado en la bibliografía - ninguno de características similares y es que precisamente ese es uno de los objetivos perseguidos en nuestro trabajo, conocer una serie de correlaciones morfológico-funcionales hasta ahora inéditas.

A pesar de ello no podemos evitar el hacer unos comentarios que pueden ser básicos para encontrar nuestras propias conclusiones.

De los resultados detallados en las microfotografías - que acompañan a este texto se deduce que a medida que aumenta el tratamiento hormonal aparece un mayor incremento de las células tecales, incluso de algunos constituyentes de la misma como son

los núcleos, hallazgos éstos que están en consonancia con lo que describiera BJERSING (1972) en el ciclo normal de la oveja.

Por la cantidad de folículos encontrados en los ovarios de los animales estudiados deducimos que los niveles de secreción de estrógenos serían altos incluso a pesar de la presencia de los niveles de progesterona dado que las células de la teca, como ha quedado dicho, presentan una disposición idónea para la síntesis de esteroides  $C_{18}$  y  $C_{19}$ , que como afirmaba MOOR (1977) la síntesis depende de una cooperación entre los elementos tecales y de la granulosa y se indica también la necesidad de que exista un contacto íntimo entre estas dos poblaciones celulares para que continúe la actividad de sintetizar esteroides. En nuestras preparaciones hemos encontrado una asociación directa entre estos dos tipos celulares como señalara MOOR (1977). No hemos encontrado una alteración evidente de las células de la granulosa como consecuencia del tratamiento experimental con progesterona. Se podría sospechar que como quiera que estas células son las encargadas de sintetizar esta hormona, fundamentalmente durante la fase luteínica, la presencia de progesterona exógena podría influir negativamente sobre la retrofuncionalidad de estas células, sin embargo, no muestran una evidencia clara de degeneración.

Como hemos podido observar en el apartado de revisión bibliográfica (vease página 90 y siguientes) existe una controversia relativa a las estructuras que rodean el folículo de Graaf, naturalmente no disponemos de unos hallazgos convincentes, por cuanto que hemos encontrado poca variación entre los animales tra

tados y los testigos y dentro de estos grupos se pueden observar diferencias individuales como queda señalado por distintos autores (O'SHEA, 1973; MERK y col., 1973; HAY y MOOR, 1975) que no -- llegan tampoco a conclusiones evidentes.

Por lo que respecta al propio folículo, ya ha quedado expuesto en la revisión bibliográfica (MARIANA, 1980) que la falta de funcionalidad puede provocar una atresia por distorsión del folículo, aunque difícil es de confirmar esta distorsión folicu--lar hay un hecho evidente y es las diferencias que hemos encontra--do entre unos y otros lotes de tratamiento en el sentido de que - los animales que recibieron mayor tratamiento progesteronico pre--sentan alteraciones más manifiestas en las tecas. También se ha - dicho en la revisión bibliográfica (HAY y col., 1979) que el foli--culo en desarrollo no está sometido a un constante ambiente hormo--nal sino que más bien, se trata de estímulos periódicos de las gonadotropinas hipofisarias. Basándonos en lo anteriormente dicho - pensamos que la presencia de altas concentraciones de progesterona durante un tiempo mayor que en el ciclo normal y en virtud de la acción de retroalimentación negativa que ejerce sobre los cen--tros superiores (hipotálamo-hipófisis), la falta de hormonas gona--dotrópicas y el desequilibrio entre las hormonas ováricas sea la causa de la mencionada distorsión y que por ello se nos explica - la presencia de mayor número de folículos quísticos en el lote de animales que recibieron el tratamiento completo de progesterona - (lote 39). La autora últimamente citada señala asimismo que este fenómeno de atresia puede ser reversible bajo ciertas condiciones entre las que se incluye la administración de PMSG, y en efecto,

nuestros hallazgos del lote 49 que recibiera esta gonadotropina sérica nos revelan la presencia de bastantes folículos rotos; -- aunque este hallazgo no es un hecho constante en todos los animales, lo que puede explicar que unas ovejas manifiesten estros -- normales inmediatamente del tratamiento con el sistema PG, mientras que en otras se produce en el segundo ciclo.

Siguiendo con la discusión general digamos que PIVKO y MAJERCISK, presentaron en el último Congreso de Reproducción --- (Madrid, 1980) un trabajo muy interesante sobre los cambios estructurales que ocasionan en el aparato genital los tratamientos hormonales pero en novillas y cerdas.

Digamos también que el método de recogida de las muestras para los estudios morfológicos se ha hecho de acuerdo con las directrices que señalan HAY y col. (1976) aunque la finalidad de estos autores es más histoquímica que la nuestra.

También conviene añadir que las muestras se han fijado en etanol, formalina, ácido acético (85 : 10 : 5) siguiendo el proceder que describieran BJERSING y col. (1972) solo que nosotros utilizamos una posterior fijación en formol, al 10%, a las 24 horas de la anterior.

Actualmente nadie duda de la versatilidad y exactitud del método del radioinmunoanálisis para la determinación cuantitativa de esteroides. Su precisión y facilidad han desterrado a otros que hace unos pocos años se tenían como muy precisos.

Efectivamente, los métodos clásicos para la determinación de esteroides han quedado desterrados; entre éstos se encuentran el método biológico descrito por ROBERTSON y RAKHA (1969), y otros autores; los métodos fluorométricos; los métodos colorimétricos basados como su nombre indica en reacciones de color; los de cromatografía de gases, que supusieron un importante paso en cuanto a incremento de sensibilidad y especificidad esteroidea; aquellos que determinan la capacidad de los esteroides para unirse competitivamente con una proteína (método CPB) con gran especificidad; etc. Como hemos dicho anteriormente el radioinmunoanálisis ha desplazado a todos estos métodos; sin embargo, actualmente se viene utilizando, con gran éxito, el método inmunoenzimático - más conocido con el nombre de ELISA para las determinaciones de concentraciones hormonales.

Creemos que los primeros autores que utilizan el radioinmunoanálisis para la determinación de hormonas sexuales en el ovino en forma cuantitativa son GODING y col. (1969), como puede apreciarse muy poco tiempo después, en el mismo año, de los que criticábamos como ya en desuso. No obstante, el método que describen los autores finalmente citados ha sido desplazado por el que hoy se utiliza y que quedó relatado con todo detalle en la parte de Material y Métodos de esta memoria y aquí discutido.

Las gráficas y cuadros de resultados de concentraciones incluidas en el apartado correspondiente, consideramos que son lo suficientemente significativas para que merezcan demasiados comentarios, pero lógicamente como éste ha sido uno de los procedimientos de nuestra experimentación sí debemos, aunque resumidamente, apuntar una serie de consideraciones para compararlas con las expuestas por otros autores y que comentaremos más adelante.

Los valores basales de progesterona en los animales tratados están comprendidos entre 1,2 y 2,0 ng/ml lo que nos indica que con pequeñas diferencias (nos referimos aquí a valores medios de cada lote) las ovejas estaban en el mismo estadio de ciclo antes de recibir el tratamiento progesterónico.

Inmediatamente después de cada administración de progesterona, los niveles de concentración plasmática de esta hormona suben notablemente, si bien esta subida es poco consistente ya -- que si no se repiten las administraciones a las 48 horas de administrada una dosis, los valores vuelven a encontrarse aproximadamente iguales que antes de la administración, (vease que sucede en el lote 49, los niveles correspondientes a los días 6 y 8 de tratamiento). Sin duda, esta caída de la concentración es debida a la corta vida media de esta hormona.

Con ligeras variaciones las curvas de concentración parecen seguir un mismo modelo en todos los lotes tratados, esto es subida de concentración al administrar una dosis de progesterona y bajada casi inmediata, para alcanzar valores casi basales antes de recibir la dosis siguiente.



Los valores extremos de concentración de progesterona - en los animales por nosotros utilizados están en 6,75 ng/ml para la oveja GF el día 42 de tratamiento y 0,03 ng/ml para la oveja Z el último día de experimentación.

Sin embargo, los animales que permanecen como testigos presentan una variabilidad menos marcada de concentraciones, lógicamente porque estos animales no reciben progesterona exógena. Pero en estos grupos de testigos nos llama una cosa poderosamente - la atención y es que a pesar de haber seguido la misma pauta en - cuanto a la citología vaginal que en los animales objeto de tratamiento, en aquellos daba la impresión de que no se encontraban en la misma fase del ciclo estral al comienzo de la observación pues a pesar de que todos los animales presentan concentraciones iniciales muy próximas, en los del lote 12 hay una tendencia a la bajada, a pesar del corto período de recogida de muestras, casi similar a la que se encuentra en el lote 42, claro que en éste al - ser el tiempo de estudio mucho mayor, después de la bajada se inicia una ascensión, similar a la de los lotes 22 y 32, da la impresión de que las concentraciones están desplazadas de unos lotes a otros aunque los valores máximos y mínimos sean muy similares.

Estas concentraciones de progesterona no han podido ser sometidas al análisis estadístico de significación por cuanto lógicamente en los testigos las concentraciones deben de ser menores al no recibir hormona exógena.

En los cuadros de concentraciones observamos algunas variaciones individuales que se salen del valor medio significativo

del lote; en realidad ésto es normal en un colectivo que incluye 245 muestras para animales tratados y 68 para los testigos, sin embargo, el análisis estadístico que se ha realizado para el total de las muestras nos da unos errores estandard de la media muy aceptables, lo que indica que los valores individuales, aunque en algunos casos dispersos, son estadísticamente válidos, confirmado también por el análisis de la varianza (vease cuadro 50).

A medida que vayamos comentando las opiniones de otros autores sobre concentraciones de progesterona en sangre periférica, haremos algunos comentarios comparativos sobre nuestros resultados.

Parece muy conveniente que hagamos un comentario al trabajo de SMITH y ROBINSON (1969) que aunque sale prácticamente del alcance bibliográfico que hemos señalado, no deja de tener su valor en lo referente a la administración de progesterona exógena a la oveja.

Estos autores determinan las concentraciones de progesterona en el plasma de la vena yugular y ovárica así como en el propio cuerpo luteo de 68 ovejas merinas cíclicas que permanecen como controles y en las de otras 32 ovejas de la misma raza que se tratan intravaginalmente con esponjas que contienen un progestágeno sintético y dicen estos autores que sus resultados sirven para dos propósitos: primero para conocer cuantitativamente los principios que afectan a la naturaleza cíclica de la función luteal y en segundo lugar, para clasificar las relaciones entre pro

gestágenos exógenos y función lutea. Por lo que se refiere al primer punto se muestra que el desarrollo funcional del cuerpo luteo sigue un modelo de curva cuadrática típica hasta la mitad del ciclo, con una regresión más precipitada que su crecimiento. Referente al segundo punto, y a nuestro entender muy importante, estos autores afirman que de sus resultados se puede concluir diciendo que no hay un mecanismo de retroalimentación aparente entre el progestágeno exógeno y la liberación de progesterona por parte del cuerpo luteo activo; de tal forma que éste no se vió afectado por la administración de progestágeno exógeno en dosis suficientemente altas como para inhibir la ovulación.

Estamos en total desacuerdo con esta afirmación de SMITH y col. (1969) por cuanto los niveles por nosotros encontrados tras la administración de progesterona exógena son superiores a los basales y lógicamente debe existir un mecanismo de retroalimentación que inhiba la ovulación, pues el proceder del sistema PG se basa en provocar el reposo ovárico mientras se administra la progesterona.

Nuestro trabajo tiene una serie de limitaciones por cuanto cada animal solamente fue estudiado en un momento determinado - con respecto al tiempo lo que hace imposible conocer los cambios - de los niveles hormonales en cualquier individuo así como las alteraciones transitorias que se puedan presentar de los niveles máximos en cualquier momento.

Por otra parte, otras limitaciones se basan en medir úni

camente las concentraciones hormonales en sangre periférica sin -  
comparar estos niveles con los de la sangre que sale del ovario,  
ya que, como hemos visto en la revisión bibliográfica y según los  
autores que han determinado ambos niveles, las diferencias son --  
muy considerables. También es conveniente señalar que las concen-  
traciones aquí reseñadas no están relacionadas con el flujo de --  
sangre que, como se sabe, varía extraordinariamente a lo largo --  
del ciclo.

A pesar de estas limitaciones el conocer las concentra-  
ciones hormonales en la sangre periférica es una buena guía para  
saber los ritmos de producción.

BJERSING (1972) llega a las siguientes conclusiones tras  
determinar las concentraciones de progesterona a lo largo del ci-  
clo estral.

La concentración mayor es el día 13 (1,3-3,2 ng/ml).

El día 15 hay una declinación abrupta (0,2-0,8 ng/ml) -  
aunque algunos animales presentaban todavía valores altos.

En las muestras incluso de las treinta horas después del  
estro, la concentración fue prácticamente indetectable.

Las concentraciones de progesterona en la vena ovárica  
son del orden de 1000 veces mayor en la sangre periférica.

Parece ser que la secreción de progesterona comienza a  
elevarse hacia las treinta horas después del celo.

Hay que tener en cuenta las variaciones individuales ya que muchos valores no concuerdan con los valores medios lo que -- confirma, en parte, lo afirmado por nosotros en cuanto a las limi taciones.

Las muestras de sangre han sido obtenidas en nuestro tra bajo a partir de la vena yugular, indistintamente del lado derecho o izquierdo, como lo han descrito la mayoría de los autores. No - obstante conviene indicar aquí lo que afirman BASSET y col.(1973): los tejidos de la cabeza del animal, presumiblemente el cerebro - en particular, extraen una cantidad considerable de progesterona de la sangre arterial que a ellos llega, más que lo puedan hacer otros tejidos periféricos, de tal forma que la concentración de - progesterona en la vena yugular representa el 69% de la que lleva la arteria, a pesar de todo, las concentraciones de la citada vena dan una imagen real de los cambios de concentración de progesterona en el plasma periférico.

BEDFORD y col. (1973) estudiando la cinética de la progesterona en la oveja preñada, encuentran como valores normales - en el ritmo de producción de esta hormona en el animal no grávido los de 0,6 a 6,74  $\mu\text{g}/\text{min}$  en la fase lutea y afirman que el hecho de que el ritmo de depuración metabólica de la progesterona, co-- rregido por kilo de peso vivo, sea igual en la oveja preñada que en la vacía (0,08 l/min/kg) hace pensar que el cambio de ritmo en la depuración puede que esté asociado con algún componente rela-- cionado con el peso del animal, sugiriendo que este factor sea el contenido total de agua en el organismo. Datos que nos parecen de

un gran interés pero que no podemos comparar por cuanto nuestro trabajo no trataba de determinar la biodisponibilidad de la progesterona administrada.

CHAMLEY y col. (1976) determinan la concentración de progesterona en un grupo de 23 ovejas merinas y encuentran unos niveles basales de progesterona entre 1,5 y 6 ng/ml. Valores que están dentro de los límites encontrados por nosotros y de acuerdo con los que señalan BASSET y col. (1973), que también hallan, como nosotros, algunos valores individuales demasiado altos.

STACY y col. (1976) encuentran también una amplia variación de concentraciones de progesterona señalando cifras que en algunas ocasiones alcanzan los 14 ng/ml.

PANT y col. (1977) estudian los cambios de concentración de esteroides ováricos e hipofisarios en ovejas Clun Forest mediante RIA, llegando a las siguientes conclusiones:

a) Las concentraciones de estradiol comienzan a elevarse a las 12-14 horas antes de la aparición del estro, son valores que varían de  $11,2 \pm 0,36$  pg/ml durante la fase lútea a  $21,1 \pm 2,01$  pg/ml encontrados a las 8 horas o en el momento del estro.

b) La progesterona circulante varió de forma cíclica con valores más altos en la mitad de la fase lútea ( $3,70 \pm 0,28$  ng/ml) si bien permanecían valores considerablemente altos hasta 35 horas antes de la aparición del estro. Los valores más bajos se encuentran unas 12 horas antes del celo, coincidiendo con el aumento de la concentración de estradiol.

c) La concentración de LH plasmática aumenta desde valores de  $2,59 \pm 0,09$  ng/ml durante la fase lutea hasta  $75,3 \pm 7,4$  - ng/ml unas 9 horas después del estro.

d) Por lo que se refiere a la concentración de FSH plasmática se pudo comprobar la existencia de picos después del estro. El primero con concentración de  $171 \pm 35,5$  ng/ml coincidió con el pico de LH y el segundo de  $133 \pm 10,7$  ng/ml apareció unas 24 horas después de registrarse los valores más bajos de LH. La concentración media de FSH en otras fases del ciclo fue de  $61,9 \pm 2,8$  - ng/ml.

Estos valores son similares a los ya descritos por HAY y MOOR (1975), pero creemos conveniente que se haga algun comentario referente a la discusión que de los resultados de estos autores hacen PANT y col. (1977): a pesar de la elevación simultánea en la liberación preovulatoria de LH y FSH se mantiene la idea de la existencia de una única hormona liberadora hipotalámica para regular la secreción de ambas gonadotropinas, la aparición de un segundo pico de FSH, no acompañado de similar elevación de LH, parece indicar la existencia de una hormona liberadora distinta para la FSH. En efecto, esta idea puede ser aceptada si tenemos en cuenta lo acontecido en otras hembras domésticas.

Contrariamente a lo que se ha dicho por algunos autores, el modelo de secreción de FSH durante la fase lutea del ciclo no presenta relaciones que puedan evidenciar cambios en el crecimiento folicular. La concentración de FSH declina gradualmente, 2-3 días antes del estro, momento coincidente con la ocurrencia de la

onda final de crecimiento folicular. Estos hallazgos parecen estar relacionados con el hecho de que el crecimiento folicular puede ser una consecuencia del aumento de utilización de la FSH circulante más que un incremento de la secreción de esta hormona como habían sugerido L'HERMITE y col. (1972).

Por lo que se refiere a la progesterona, los resultados de PANT y col. (1977), sugieren que esta hormona no se secreta hasta 2 días después del estro. Por tanto, la ausencia de elevación preovulatoria de progesterona en la oveja excluye cualquier papel directo de esta hormona en la liberación de LH y FSH. Por otra parte, la onda ovulatoria de estas dos últimas hormonas fué precedida de una clara elevación de estradiol, elevación que parece ser la responsable de la onda ovulatoria de ambas gonadotropinas, por la liberación de hormonas hipotalámicas, existiendo un sinergismo de ambas hormonas en el momento de la ovulación.

De los resultados encontrados por nosotros no podemos hacer una comparación exhaustiva en los hallazgos de estos autores - dado que el diseño de experimentación no puede ser comparable. Sin embargo, por lo dicho se pueden aclarar algunos conceptos que hasta ahora no permanecían demasiado claros. Esperamos que en un futuro próximo cuando estemos en condiciones de determinar las hormonas hipotalámicas objeto de un trabajo que tenemos proyectado, se puedan confirmar estos sinergismos y aportar también algo de luz sobre esta problemática interhormonal que no parece estar demasiado clara en la oveja.



A pesar de ésto sí podemos comparar las cifras que indican PANT y col. (1977) con las encontradas por nosotros, haciendo la salvedad de que estos autores las estudian a lo largo del ciclo y nosotros solo lo hacemos cuando se les administra la hormona exógenamente. No obstante, nuestros testigos, sobre todo los del lote 49, pueden ser indicativos de casi todo un ciclo estral y aunque no se llega a alcanzar los 3,7 ng/ml que indican esos autores, obtenemos valores próximos a los 2,5 ng/ml.

FITZGERALD y BUTLER (1978) señalan una elevación transitoria (1-4) días de la progesterona circulante antes de aparecer la verdadera elevación ovulatoria de esta hormona. RYAN y FOSTER (1978) por su parte, encuentran también que la progesterona periférica aumenta durante 2-3 días antes de la oleada de LH que aparece en la fase lutea normal. Estos autores sugieren que esa elevación prepuberal transitoria fue producida bien por una ovulación prematura o por luteinización folicular dentro del ovario.

Con el fin de aclarar si esas elevaciones transitorias de progesterona son verdaderas o debidas a otras fuentes como pueden ser las adrenales, demostradas en otras especies, BERNARDINELLI y col. (1980) hicieron un trabajo experimental muy minucioso utilizando ovejas prepuberales llegando a la conclusión de que, en efecto, la progesterona circulante antes de la pubertad en las ovejas es producida únicamente por el tejido luteo del ovario.

CHAMLEY y col. (1976) después de inyectar  $\text{PGF}_{2\alpha}$  directamente en el cuerpo luteo encuentran una disminución consistente -

de la concentración plasmática de progesterona, pero no hallan una luteolisis definitiva demostrada histológicamente.

Las concentraciones de progesterona a lo largo del ciclo estral de la oveja han sido analizadas como hemos visto por un -- gran número de autores; sin embargo, no existe un criterio unifor me en lo que se refiere a las relaciones entre número de cuerpos luteos, sistema de ovulación natural y concentración de progesterona, aunque nuestro punto de vista después de estudiados parte - de esos trabajos, es que el factor genético del animal juega un - papel importante en esas correlaciones. Este punto de vista es man tenido por QUIRKE y col. (1979) que trabajando con tres razas dis tintas de ovejas (Finnish Landrace, Fingalway y Galway) encuentran valores diferentes, estadísticamente significativos.

Insistiendo un poco más sobre la posible correlación - entre concentración de progesterona y la posible presencia de -- cuerpos luteos persistentes hemos de señalar que han sido varios los autores que utilizan los niveles periféricos de la hormona - como signo de la capacidad funcional de la gónada, aunque algu-- nos como ALONSO DE MIGUEL y COGNIE (1980) afirman que el índice que se ha descrito de 0,5 ng/ml de progesterona para considerar un cuerpo luteo funcional, es insuficiente.

GAYERIE y col. (1980) señalan la concentración de 1 ng/ ml de progesterona plasmática para conocer si el animal tiene -- cuerpos luteos no funcionales.

Aún cuando existen diferencias entre las razas en cuanto al ritmo de ovulación, ésto parece traducirse en los diferentes niveles de progesterona en fase luteínica, pero la relación entre número de cuerpos luteos y progesterona plasmática no es una función lineal simple.

Sin embargo, WHEELER (1978) dice que la concentración de progesterona periférica no está relacionada con el tipo de raza (estudia concentraciones de progesterona en tres razas distintas de ovejas) ni a la cantidad de cuerpos luteos que estén en un ovario o en otro.

Es evidente que el aumento sucesivo del ritmo de ovulación que encuentran QUIRKE y col. (1979) se ve acompañado por un incremento desproporcional en el nivel de progesterona. También se sugiere una dependencia del nivel de progesterona plasmática de la fase luteica en el número de cuerpos luteos. Quizá fuera preciso hacer un trabajo adicional encaminado a obtener estos datos únicamente y trabajar con mayor número de animales, objetivo que se sale del propósito de nuestro trabajo pero que, de cualquier forma, era preciso comentar.

Por otro lado y a tenor de lo encontrado en la bibliografía existe una asociación positiva entre el número de cuerpos luteos encontrados en el ovario tras la estimulación con PMSG y progesterona plasmática (THORBURN y col., 1969), durante el ciclo estral de la oveja y de otras especies también, aunque este punto de vista no es mantenido por todos los autores, quizá la explica-

ción esté en lo que dicen PLOTKA y col. (1970) al afirmar que el contenido de progesterona del tejido luteo de la oveja está fundamentalmente relacionado con el peso del cuerpo luteo más que con el número de éstos o con el día del estro. La imposibilidad de pesar los cuerpos luteos encontrados por nosotros no nos permite -tomar partido en una u otra corriente de afirmaciones.

De cualquier forma, estos puntos últimamente tratados -no parece que estén demasiado aclarados ya que hay opiniones en--contradas.

Por último queremos hacer hincapié después de todo lo -analizado de los hallazgos encontrados por nosotros y que han quedado reflejados como medias de todos los animales tratados en la gráfica nº 5.

Contemplando dicha gráfica nos podemos preguntar como al final de la experimentación los animales testigos presentan unas -concentraciones de progesterona superiores a los tratados. La explicación resulta sencilla si se tienen en cuenta los tratamientos aplicados así como parte de lo antedicho en este capítulo de Discusión. La elevación de progesterona que se observa en los animales testigos se debe a concentraciones propias del ciclo estral de los mismos aunque quizá con valores un poco por encima de los encontrados en la literatura y ya comentados. Sin embargo, los valores de las ovejas tratadas presentan unos bajos niveles como consecuencia de los mecanismos de retroalimentación desencadenados por la PMSG; pues como puede observarse en la gráfica ya comentada precisamente

la caída de progesterona coincide con la administración de la gonadotropina sérica. Posiblemente esta sea una de las razones que justifiquen la baja fertilidad que se encuentra en el primer estrosio siguiente a la sincronización del celo.

185

## 7.- CONCLUSIONES

Primera:

Los cambios secuenciales en los tipos de células encontrados en la citología vaginal, no son específicos para determinar los distintos estadios en el ciclo estral de la oveja.

Segunda:

El tratamiento con progesterona y PMSG aumenta notablemente las secreciones en el aparato genital de la oveja, hecho - que puede disminuir la fecundidad por cuanto puede inhibir la motilidad espermática.

Tercera:

Antes de iniciarse el tratamiento los valores basales - de progesterona estaban comprendidos entre 1,2 y 2,0 ng/ml, lo - que indica que los animales se encontraban en la misma fase del ciclo.

Cuarta:

Con ligeras variaciones las curvas de concentración de progesterona parecen seguir un mismo modelo en todos los lotes - de tratamiento; ésto es, subida de concentración al administrar una dosis de progesterona y disminución al alcanzar valores casi basales antes de recibir la dosis siguiente.

Quinta:

En los animales pertenecientes a los lotes 1º y 2º prácticamente no se observa ninguna modificación estructural en el - tracto genital de las muestras estudiadas. Es necesaria la apli-

cación de una tercera dosis de progesterona para que las modificaciones sean evidentes.

Sexta:

A medida que aumentan las dosis de progesterona administrada se incrementa el número de cuerpos luteos y folículos quísticos que se encuentran en el ovario y podemos encontrar mayor -- cantidad de secreción en el lumen del oviducto.

Séptima:

El grosor del miometrio del cuerpo uterino es mayor en -- los animales que reciben más de dos dosis de progesterona.

Octava:

Se observa un aumento de las glándulas tubulares y del -- epitelio pseudoestratificado del cuerpo y cuello uterino en los -- animales que reciben el tratamiento completo del sistema PG.

Novena:

No se han evidenciado alteraciones notables en las células de la granulosa como consecuencia del tratamiento lo que parece indicar que los niveles de secreción de estrógenos no estarían alterados.

Décima:

Las células tecales que recibieron mayor tratamiento progesterónico presentaron alteraciones más manifiestas.



Ante los hechos encontrados en nuestra experimentación nos atrevemos a insinuar como posible explicación a la disminución de la fertilidad en el primer estro siguiente a la sincronización por el sistema PG, lo siguiente:

- a) La administración de progesterona inhibe la secreción continuada de LH preovulatoria.
- b) La administración de progesterona debe alterar el -- equilibrio esteroideo de la hembra, equilibrio que -- debe ser óptimo en el momento de la ovulación para -- la subsiguiente fertilización, dada la importancia -- que tiene ese equilibrio tanto para el transporte del oocito hasta el lugar de la fecundación como para -- crear en el útero el ambiente adecuado para su poste-- rior desarrollo en caso de fertilización.
- c) El aumento de secreción de mucosidad puede que sea -- un factor determinante negativo en el transporte del oocito y/o del esperma.

281

## 8.- RESUMEN

El presente trabajo se diseñó con el fin de poder encontrar la causa de una disminución de la fecundidad en la aparición del primer celo subsiguiente al tratamiento. Los animales antes de comenzar el tratamiento se encontraban en diestro. El número de animales en experimentación fue de 36 distribuidos en 4 lotes de tratamiento. Mientras los animales se encontraban en experimentación, se recogieron muestras de sangre cada 24 horas para poder determinar las concentraciones de progesterona por RIA. Terminado el tratamiento, los animales se fueron sacrificando secuencialmente, realizando el examen macroscópico del aparato genital, a la vez que en el 50% de los animales se realizó la perfusión de la arteria ovárica en el momento del sacrificio para realizar mejor el estudio microscópico. Hemos dispuesto de un total de 2.500 preparaciones histológicas. Las modificaciones estructurales más sobresalientes encontradas y achacables a dicho sistema de sincronización del celo son:

Aumento del número de cuerpos luteos y folículos quísticos en los animales que recibieron mayor dosis de progesterona. Mayor secreción en el lumen de la trompa, mayor grosor del miometrio a nivel del cuerpo uterino, aumento del número de glándulas tubulares y epitelio pseudoestratificado en el cuello.

#### SUMMARY

The present task was designed in order to find the --- cause for a decrease in the fertility of animals in the first -- oestrus after being under treatment. The sheep beginning the -- treatment were in the dioestrus. This experiment involved 36 animals divided in 4 groups.

Blood samples were taken every 24 hours in order to determine the concentrations of progesterone by RIA while the animals were under treatment. Once the experiment was completed the animals were slaughtered in a periodic sequence. Then a macroscopic examination of the genital tract was conducted.

At the same time, 50% of the animals in the study group were subject to the perfusion of the ovarian artery at the moment they were slaughtered. This was done with the aim to facilitate a better microscopic study. We worked with a total of 2500 histologic glass slides.

We found that the most important structural modifications owing to oestrus synchronization sistem were the following:

- An increase in the number of corpus luteous and cystic follicles in those animals which were given more dose of progesterone. A higher secretion in the lumen of the Fallopian tube. A -- greater thickness of the miometrium at the level of the uterine - body. An increase in the number of the tubular glands and also an increase in the pseudostratified epithelium in the cervix.

232

## 9.- BIBLIOGRAFIA

1. ABAD GAVIN, M.- "Patología del ovario en la oveja". En: IX - Congreso Internacional de Reproducción Animal e Inseminación Artificial: Editorial Garsi, Madrid, 1980, vol.1, p. 177-192.
2. ACRIPTOPOULOU, S.; W. HARESING y G.E. LAMMING.- "Time of ovulation in ewes after treatment with a prostaglandin F<sub>2α</sub> analogue".  
*J. Reprod. Fert.* 54: 189-191, 1978.
3. ADAMS, N.R.- "Morphological changes in the organs of ewes -- grazing estrogenic subterranean clover".  
*Res. Vet. Sci.* 22: 216-221, 1977.
4. ADAMS, N.R.; C.M. OLDHAM y R.A. HEYDON.- "Ovulation rate and oocyte numbers in ewe after prolonged exposure to oestrogenic pasture".  
*J. Reprod. Fert.* 55: 87-89, 1979.
5. ALONSO DE MIGUEL, M y Y. COGNIE.- "Variaciones de la actividad sexual de la oveja "Rasa aragonesa" durante el período de anoestro estacionario. Efecto de la edad, de las condiciones climáticas y de la presencia de machos". En: IX Congreso Internacional de Reproducción Animal e Inseminación Artificial: Editorial Garsi, Madrid, 1980, vol. 3, p. 127.
6. AMBACH, G. ; P. KIVOVICS y M. PALKOVITS.- "The arterial and venous blood supply of the preoptic region in the rat"  
*Acta Morphol. Acad. Sci. Hung.* 26: 21-41, 1978.
7. BAIRD, D.T.- "Pulsatile secretion of LH and ovarian estradiol during the follicular phase of the sheep estrous cycle".  
*Biol. Reprod.* 18: 359-364, 1978.

8. BAIRD, D.T.; J.A. McCRAKEN y J.R. GODING.- "Studies in steroid synthesis and secretion with the autotransplanted sheep ovary and adrenal". En: The Endocrinology of Pregnancy and Parturition. Experimental studies in the sheep. The Proceedings of International Symposium in Cardiff. 1971. Ed. por C. G. Pierrepoint: Editorial Alpha Omega Alpha Pub. 1973, p. 5.
9. BAIRD, D.T. y R.J. SCARAMUZZI.- "The source of ovarian oestradiol and androstenedione in the sheep during the luteal phase". *Acta Endocrinol.* 83: 402-409, 1977.
10. BARRACLOUGH, C.- "Sex steroid regulation of reproductive neuroendocrine processes". En: Handbook of Physiology, sección 7, Endocrinology vol II Female Reproductive System, parte 1. Ed. por R.O. Greep y E.B. Astwood: Editorial American Physiological Society, Washington 1973, p. 29-56.
11. BASSETT, J.M. y G.D. THORBURN.- "Circulating levels of progesterone and corticosteroides in the pregnant ewe and its foetus". En: The Endocrinology of Pregnancy and Parturition. Experimental studies in the sheep. The Proceedings of International Symposium in Cardiff. 1971. Ed. por C.G. Pierrepoint: Editorial Alpha Omega Alpha Pub. 1973, p. 126.
12. BEDFORD, C.A.; F.A. HARRISON y R.B. HEAP.- "The kinetics of progesterone metabolism in the pregnant sheep". En: The Endocrinology of Pregnancy and Parturition. Experimental studies in the sheep. The Proceedings of International Symposium in Cardiff. 1971. Ed. por C.G. Pierrepoint: Editorial Alpha Omega Alpha Pub. 1973, p. 83.

13. BENOIT, H.J.; R. BORTH; A.R. ELLICOTT; C.A. WOOLEVER y P.Y. WANG.- "An intraabdominal chamber for continuous longterm observation of the sheep ovary".  
*Biomat. Med. Dev. Art. Org.* 4: 119-132, 1976.
14. BERARDINELLI, J.G.; R.A. DAILEY; R.L. BUTCHER y E.K. INSKEEP.  
- "Source of circulating progesterone in prepuberal ewes".  
*Biol. Reprod.* 22: 233-236, 1980.
15. BJERSING, L.; M.F. HAY; G. KANN; R.M. MOOR; F. NAFTOLIN; R.J. SCARAMUZZI; R.V. SHORT y E.V. YOUNGLAY.- "Changes in gonadotrophins, ovarian steroids and follicular morphology in sheep at oestrus".  
*J. Endocr.* 52: 465-479, 1972.
16. BRAND, A. y W.H.R. De JONG.- "Qualitative and quantitative micromorphological investigations of the tertiary follicle population during the oestrous cycle in sheep".  
*J. Reprod. Fert.* 33: 431-439, 1973.
17. BRUCE, N.W. y R.M. MOOR.- "Capillary blood flow to ovarian - follicles, stroma and corpora lutea of anaesthetized sheep".  
*J. Reprod. Fert.* 46: 299-304, 1976.
18. CAHILL, L.P.; J.C. MARIANA y P. MAULEON.- "Total follicular populations in ewes of high and low ovulation rates".  
*J. Reprod. Fert.* 55: 27-36, 1979.
19. CAMPO, C.H. DEL y O.J. GINTHER.- "Vascular anatomy of the -- uterus and ovaries and the unilateral luteolytic effect of - the uterus: horses, sheep and swine".  
*Am. J. Vet. Res.* 34: 305-316, 1973a.



20. CAMPO, C.H. DEL y O.J. GINTHER.- "Vascular anatomy of the -- uterus and ovaries and the unilateral luteolytic effect of - the uterus: angioarchitecture in sheep".  
*Am. J. Vet. Res.* 34: 1377-1385, 1973b.
21. CAMPO, C.H. DEL y O.J. GINTHER.- "Vascular anatomy of the ute rus and ovaries and the unilateral luteolytic effect of the - uterus: Histologic structure of uteroovarian vein and ovarian artery in sheep".  
*Am. J. Vet. Res.* 35: 397-399, 1974.
22. CASIDA, L.E.; C.O. WOODY y A.L. POPE.- "Inequality in function of righ and left ovaries uterine horns of the ewe".  
*J. Anim. Sci.* 26: 1169-1180, 1966.
23. CATT, K.J.; M.L. DUFAU y T. TSURUHARA.- "Radioligand-receptor assay of luteinizing hormone and chorionic gonadotropin".  
*J. Clin. Endocr. Metab.* 34: 123-132, 1972.
24. CHAMLEY, W.A. y J.D. O'SHEA.- "Luteal function in sheep injec ted with prostaglandin F<sub>2α</sub> directly into the corpus luteum".  
*Prostaglandins* 11: 133-142, 1976.
25. CHANNING, C.P.; F.W. SCHAEFER; L.D. ANDERSON y A. TSAFRINI.- "Ovarian follicular and luteal physiology". En: Reproductive Physiology III. Ed. por Roy O. Greep: University Park Press, Baltimore, 1980, p. 117-201.
26. CHRISTENSEN, A.K y S.W. GUILLIN.- "The correlation of fine - structure and function in steroid-secreting cells with enpha sis on those of the gonads". En: Gonads. Ed. por K.W. McKerns: Editorial Nord Holland Publising Co., 1969, p. 415-488.

27. CLARKE, I.J. y M.F. McDONALD.- "The influence of gonadotropic stimulation progestagen synchronisation in the ewe".  
*N.Z.J. Agric. Res.* 18: 19-22, 1975.
28. COGNIE, Y. y J. PELLETIER.- "Preovulatory LH release and ovulation in dry and lactating ewes after progestagen and PMSG treatment during the seasonal anoestrus".  
*Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* 16: 529-536, 1976.
29. COMLINE, R.S.- "Maternal factors in the maintenance of ovine pregnancy". En: The Endocrinology of Pregnancy and Parturition. Experimental studies in the sheep. The Proceeding of International Symposium in Cardiff 1971. Ed. por C.G. Pierrepoint: Editorial Alpha Omega Alpha Pub., Cardiff, 1973, p. 1.
30. CORTEEL, M.- "Etude histologique de la transformation du follicle preovulatoire en corps jaune cyclique chez brebis. I Evolution des ultrastructures des cellules de la granulosa".  
*Ann. Bio. Anim. Biochim. Biophys.* 13: 249-260, 1973.
31. COUDERT, S.P.; C.D. PHILLIPS; C. FAIMAN; W. CHERNECKI y M. PALMER.- "A study of the utero-ovarian circulation in sheep with reference to local transfer between venous and arterial blood".  
*J. Reprod. Fertil.* 36: 319-331, 1974.
32. COX, R.I.; P.E. MATTNER y G.D. THORBURN.- "Changes in ovarian secretion of oestradiol-17 $\beta$  around oestrus in the --- sheep".  
*J. Endocr.* 49: 345-346, 1971.

33. CUNHA, G.- "The dual origin of vaginal epithelium".  
*Am. J. Anat.* 143: 387-392, 1975.
34. DAVIS, S.L. y M.L. BORGER.- "Dynamic changes in plasma prolactin luteinizing hormone and growth hormone in ovariectomized ewes".  
*J. Anim. Sci.* 38: 795-802, 1974.
35. DAVIS, S.L.; D.L. OHLSON; S. KLINDT y M.S. ANFINSON.- "Episodic patterns of prolactin and thyrotropin secretion in rams and wethers: influence of testosterone and diethylstilbestrol".  
*J. Anim. Sci.* 46: 1724-1729, 1978.
36. DELMAN, H.D. y E.M. BROWN.- "Textbook of Veterinary Histology". Editorial Lea & Febiger, Filadelfia, 1976.
37. DENAMUR, R. y G. KANN.- "Luteolytic effects of oestradiol after hypophysectomy or pituitary stalk section in cycling sheep".  
*Acta Endocrinol.* 73: 635-642, 1973.
38. DENAMUR, R.; G. KANN y R.V. SHORT.- "How does the corpus luteum of the sheep know that there is an embryo in the uterus?". En: The Endocrinology of Pregnancy and Parturition. Experimental studies in the sheep. The Proceedings of International Symposium in Cardiff. 1971. Ed. por C.G. Pierrepont: Editorial Alpha Omega Alpha Pub., Cardiff, 1973, p. 2.
39. DIMINO, M.J.; E.A. ELFONT y S.K. BERMAN.- "Changes in ovarian mitochondria: Early indicators of follicular luteinization".  
*Adv. Exp. Med. Biol.* 112: 505-520, 1979.

40. DINGLE, J.T.; M.F. HAY y R.M. MOOR.- "Lysosomal function in the corpus luteum of the sheep".  
*J. Endocr.* 40: 325-336, 1968.
41. DOTT, H.M.; M.F. HAY; D.G. CRAN y R.M. MOOR.- "Effect of exogenous gonadotrophin (PMSG) on the antral follicle population in the sheep".  
*J. Reprod. Fert.* 56: 683-689, 1979.
42. DUCKER, M.J. y J.S. BOYD.- "An evaluation of the vaginal -- smear technique for detecting the occurrence of ovulation in the ewe".  
*J. Reprod. Fert.* 41: 249-251, 1974.
43. DUFOUR, J.; O.J. GINTHER y L.E. CASIDA.- "Corpus luteum - action on ovarian follicular development after destruction of macroscopically visible follicles in ewes".  
*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 138: 475-478, 1971.
44. DUFOUR, J.; O.J. GINTHER y L.E. CASIDA.- "Intraovarian relationship between corpora lutea and ovarian follicles in ewes".  
*Am. J. Vet. Res.* 33: 1445-1456, 1972.
45. DUTT, R.M. y L.E. CASIDA.- "Alteration of estrual cycle in - sheep by the use of progesterone and its effect upon subsequent ovulation and fertility".  
*Endocrinology* 43: 208-217, 1948.
46. EASTWOOD, K.C. y M.F. McDONALD.- "Maintenance of oestrus synchronization in two year-old ewes at second heat after progestagen sponge treatment".  
*N.Z.J. Agric. Res.* 18: 119-121, 1975.

47. EDEY, T.N. y C.J. THWAITES.- "Synchronisation of ewes at the second oestrus after progestagen treatment".  
*Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.* 6: 38-43, 1966.
48. ELLENDORFF, F.- "Parturition in the sheep and goat". En *Physiology and control of parturition in domestic animals*. Ed. por Ellendorff, Taverne y Smidt: Editorial Elsevier. Amsterdam, 1979, p. 167-253.
49. ELLENDORFF, F. "Papel del sistema límbico en el control de la liberación de LH".  
*Comunicación personal*, 1980.
50. FITZGERALD, J.A. y W.R. BUTLER.- "Reproductive hormone patterns from birth to puberty in the ewes lambs". En *Proc. of the Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction*. Carbondale, 1978, vol. II, p. 55, resum. 110.
51. FORTMEYER, H.P.; D. BERG; K. BONATH y A. KIRSCHNER.- "Brunst-synchronisation und Trächtigkeitsdiagnose bei schafen".  
*Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* 79: 51-55, 1972.
52. FRENCH, L.R.- "Effects of small diameter IUD's on fertility and lengths of estrous cycles in ewes".  
*J. Anim. Sci.* 43: 1254-1263, 1976.
53. FULKERSON, W.J.- "Synchronous episodic release of cortisol in the sheep".  
*Endocrinol.* 79: 131-132, 1978.
54. FUKU, K.; A. LONSTROM; T. HOKFELT; L. FERLAND; K. ANDERSSON; L. AGNATI; P. ENEROTH; J.A. GUSTAFSSON y P. SKETT.- "Influence

of central catecholamines on LHRH containing pathways".

*Clinics Obs. Gyn.* 5: 251-269, 1978.

55. GADEV, C.- "Untersuchungen über die pigmente in der gebärmutter und der plazenta beim schaf".

*Zbl. Vet. Med. A.* 18: 521-529, 1971.

56. GAY, V.L.; A. REES y G.D. NISWENDER.- "Patterns of gonadotrophin secretion associated with ovulation".

*Fed. Proc.* 29: 1880-1887, 1970.

57. GAYERIE, F.; Y. COGNIE y A. LOCATELLI.- "Pituitary and ovarian activity before and after PMSG in "Ile de France" ewes after autumn and spring lambing". En: IX Congreso Internacional de Reproducción Animal e Inseminación Artificial: Editorial Garsi, Madrid, 1980, vol. 3, p. 49 (resum).

58. GEMMELL, R.T.; B.D. STACY y G.D. THORBURN.- "Morphology of the regressing corpus luteum in the ewe".

*Biol. Reprod.* 14: 270-279, 1976.

59. GINTHER, O.J. y C.O. WOODY.- "Influence of exogenous progesterone and uterus on ovarian follicles of sheep and heifers".

*Am. J. Vet. Res.* 31: 87-90, 1970.

60. GINTHER, O.J. y G.E. BISGARD.- "Role of the main uterine vein in local action of an intrauterine device in the corpus luteum in sheep".

*Am. J. Vet. Res.* 33: 1583-1587, 1972.

61. GINTHER, O.J. y C.H. DEL CAMPO.- "Luteolysis and the uteroovarian vasculature in ewes".

*J. Anim. Sci.* 37: 312 (Resum.), 1973.

62. GINTHER, O.J.; C.H. DEL CAMPO y C.A. RAWLINGS.- "Vascular - anatomy of the uterus and ovaries and the unilateral luteo-lytic effect of the uterus: a local venoarterial pathway between uterus and ovaries in sheep".  
*Am. J. Vet. Res.* 34: 723-728, 1973a.
63. GINTHER, O.J. y C.H. DEL CAMPO.- "Vascular anatomy of the - uterus and ovaries and the unilateral effect of the uterus: areas of close apposition between the ovarian artery and -- vessels which contain uterine venous blood in sheep".  
*Am. J. Vet. Res.* 34: 1387-1394, 1973b.
64. GODING, R.; K.J. CATT; J.M. BROWN; C.C. KALTENBACH; I.A. CUMMING y B.J. MOLE.- "Radioimmunoassay for ovine luteinizing - hormone during estrus and following estrogen administration in the sheep".  
*Endocrinol.* 85: 133-142, 1969.
65. GONZALEZ LOPEZ, J.; E. MATEOS; M. ESPEJO y J. ALVAREZ.- "Sin cronización del celo en ganado ovino. Influencia de: dura--ción del tratamiento, época y sistemas de cubrición, estado fisiológico del animal y dosis de PMSG". En: IX Congreso Internacional de Reproducción Animal e Inseminación Artificial: Editorial Garsi, Madrid, 1980, vol. 4 (en prensa).
66. GONZALEZ-STAGNARO, C.; A. ESTEVA-HERNANDEZ y J. GOYCOECHEA-LLAQUE.- "Sincronización del celo e inseminación artificial en ovejas west african en zonas áridas". En: IX Congreso Internacional de Reproducción Animal e Inseminación Artificial: Editorial Garsi, Madrid, 1980, vol. 3, p. 181 (resum.).

67. GOODMAN, R.- "The site of the positive feedback action of estradiol in the rat".  
*Endocrinol.* 102: 151-159, 1978.
68. GRAWT, C.G. y R.R. WARREN.- "Sheep breeding program for the year-round production of timed pregnancies for experimental foetal surgery".  
*Lab. Anim.* 14: 317-321, 1980.
69. HAFEZ, E.S.E.- "Physiological mechanism of ovulation". En: IX Congreso Internacional de Reproducción Animal e Inseminación Artificial: Editorial Garsi, Madrid, 1980, vol. 3, p. 70 (resum.).
70. HARESING, W.- "Ovarian response to synthetic LH-RH in anoestrous ewes".  
*J. Reprod. Fert.* 44: 127-129, 1975.
71. HARKNESS, R.D.- "The physiology of the connective tissue of the reproductive tract". En: Inter. Rev. of Connective Tissue Research: Editorial Academic Press, New York, 1964, - vol. 2, p. 155-211.
72. HAWK, H.W. y B.S. COOPER.- "Sperm transport into the cervix of the ewe after regulation of estrus with prostaglandin or progestagen".  
*J. Anim. Sci.* 44: 638-644, 1977.
73. HAY, M.F. y MOOR, R.M.- "Functional and estructural relationships in the grafian follicle population of the sheep ovary".  
*J. Reprod. Fert.* 45: 583-593, 1975.



74. HAY, M.F.; D.G. CRAN y R.M. MOOR.- "Structural changes occurring during atresia in sheep ovarian follicles".  
*Cell Tissue Res.* 169: 515-529, 1976.
75. HAY, M.F.; R.M. MOOR; H.M. DOTT y D.G. CRAN.- "Regeneration of atretic sheep ovarian follicles "in vitro"". *J. Reprod. Fert.* 55: 195-207, 1979.
76. HENDERSON, K.M. y K.P. McNATTY.- "A biochemical hypothesis - to explain the mechanism of luteal regression".  
*Prostaglandins* 9: 779-783, 1975.
77. HOFFMAN, J.C.- "Light and feed-back control of gonadotrophin secretion". En: Endocrinology, Proceedings of the IV International Congress of Endocrinology Washington 1972. Editorial Excerpta Medica, Amsterdam y American Elsevier Publishing Co., New York, p. 886-890.
78. HUGHES, F.; J.M.S. LUCAS y A.B. NOTMAN. "The synchronization of oestrus and subsequent fertility in ewes following treatment with a synthetic prostaglandin analogue".  
*Prostaglandins* 11: 1033-1039, 1976.
79. HULET, C.V. y W.C. FOOTE.- "Ovulatory response of the ewe to repeated injection of PMS".  
*J. Anim. Sci.* 29: 457-463, 1969.
80. HUNT, W.I.; D. ADDOLEMAN y R. BOGART.- "Induction of multio<sup>u</sup>lation in the ewe following synchronization of estrus".  
*J. Anim. Sci.* 32: 491-495, 1971.

81. INSKEEP, E.K.- "Potential uses of prostaglandins in control of reproductive cycles of domestic animals".  
*J. Anim. Sci.* 36: 1149-1157, 1973.
82. INSKEEP, E.K.- "Artificial insemination in sheep". En: West Virginia University. Agricultural Experiment Station, 1974, Bulletin 629 (part I).
83. INSKEEP, E.K.; W.J. SMUTNY; R.L. BUTCHER y J.E. PEXTON.- "Effects of intrafollicular injections of prostaglandins in nonpregnant and pregnant ewes".  
*J. Anim. Sci.* 41: 1098-1104, 1975.
84. INSKEEP, E.K. y W.J. MURDOCH.- "Relation of ovarian functions to uterine and ovarian secretion of prostaglandins during the estrous cycle and early pregnancy in the ewe and cow". En: *Reproductive Physiology III*. Ed: por Roy O. Greep: University - Park Press, Baltimore, 1980, vol. 22, p. 325-356.
85. JENNINGS, J.J. y J.P. CROWLEY.- "The influence of mating management on fertility in the ewes following progesterone PMS treatment".  
*Vet. Rec.* 90: 495-498, 1972.
86. KARSCH, F.J. "Seasonal reproduction: a saga of reversible fertility".  
*Physiologist* 23 (6): 28-38, 1980.
87. KATO, J. y T. ONOUCHI.- "Specific progesterone receptors in the hypothalamus and anterior hypophysis of the rat".  
*Endocrinol.* 101: 920-928, 1977.

88. KINDAHL, H.; J.O. LINDELL y L.E. EDQVIST.- "Luteolysis in - domestic animals: control of PGF<sub>2α</sub> release". En: IX Congreso Internacional de Reproducción Animal e Inseminación Artificial: Editorial Garsi, Madrid, 1980, vol. 2, p. 17-26.
89. KITCHEN, H.- "Sheep as animal model in biomedical research". *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 170: 615-619, 1977.
90. LADNER, C.; C.R. BRINKMAN III; P. WESTON y N.S. ASSALI.- "Dynamics of uterine circulation in pregnant and nonpregnat -- sheep". *Am. J. Physiol.* 218: 257-263, 1970.
91. LAND, R.B.- "Genetic control of ovulation rate". En: IX Congreso Internacional de Reproducción Animal e Inseminación Artificial: Editorial Garsi, Madrid, 1980, vol. 2, p. 63-70.
92. LAND, R.B.; A.G. EHEELER y W.R. CARR.- "Seasonal variation in the oestrogen induced LH discharge of ovariectomized Finnish Landrace and Scottish Blackface ewes". *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 16: 521-528, 1976.
93. LAND, R.B.; W.R. CARR y R. THOMPSON.- "Genetic and environmental variation in the LH response of ovariectomized sheep to LH-RH". *J. Reprod. Fert.* 56: 243-248, 1979.
94. LEGAN, S.J.; F.J. KARSCH y D.L. FOSTER.- "The endocrine control of seasonal reproductive function in the ewe: A marked change in the response to the negative feed-back action of estradiol on luteinizing hormone secretion". *Endocrinol.* 101: 818-824, 1977.

95. LEGAN, S.J. y F.J. KARSCH.- "Neuroendocrine regulation of -  
the oestrus cycle and seasonal breeding in the ewe".  
*Biol. Reprod.* 20: 74-85, 1979.
96. LEMAN, A.D.; P.J. DZIUK y B.B. DOANE.- "Synchronization of  
estrus and shortening of the interval between lambings by -  
induction of estrus and of ovulation during anestrus".  
*J. Am. Med. Assoc.* 157: 1574-1576, 1970.
97. LEWIS, P.E.; D.J. BOLT y E.K. INSKEEP.- "Luteinizing hormone  
release and ovulation in anestrus ewes".  
*J. Anim. Sci.* 38: 1197-1203, 1974a.
98. LEWIS, P.E.; D.J. BOLT y E.K. INSKEEP.- "Pattern of luteini  
zing hormone release in progestin treated ewes".  
*J. Anim. Sci.* 38: 1204-1209, 1974b.
99. LEWIS, G.S.; R.L. FOGWELL; W.V. THAYNE y E.K. INSKEEP.- "Va  
riation in uterine venous PGF in ewes".  
*J. Anim. Sci.* 42: 1677 (Resum.), 1976.
100. L'HERMITE, M.; G.D. NISWENDER; L.E. REICHTERS y A.R. MIDGLEY  
Jr.- "Serum follicle stimulating-hormone in sheep as measu  
red by radioimmunoassay".  
*Biol. Reprod.* 6: 325-332, 1972.
101. LIDNER, H.R.; A. TSAFRIRI; M.E. LIEBERMAN; U. ZOR; Y. KOCH;  
S. BAUMINGER y A. BARNEA.- "Gonadotrophin action on cultured  
Graafian follicles: induction of maturation division of the  
mammalian oocyte and differentiation of the luteal cell.  
*Recent. Prog. Horm. Res.* 30: 79-127, 1974.

102. LIEBERMAN, M.E.; A. TSAFRIRI; S. BAUMINGER; W.P. COLLINS; K. AHREN y H.A. LINDNER.- "Oocytic meiosis in cultured rat follicles during inhibition of steroidogenesis".  
*Acta Endocr. (Kbh)*. 83: 151-157, 1976.
103. LINDSAY, D.R. y J.P. SIGNORET.- "Influence of behaviour on reproduction". En: IX Congreso Internacional de Reproducción Animal e Inseminación Artificial: Editorial Garsi, Madrid, - 1980, vol. 1, p. 83-92.
104. LOPEZ SEBASTIAN, A.; M. CASTILLO; T. PEREZ GARCIA y K.I. INSKEEP.- "Efectos de la duración del tratamiento con un progestágeno y la presencia de moruecos en la respuesta a la GnRH en ovejas manchegas en anoestro de lactación".  
*Ann. Inst. Nac. Inv. Agr. (Serie: Producción Animal)* 11: 83-94, 1980.
105. MALLAMPATI, R.S. y L.E. CASIDA.- "Absence of ovarian compensatory hypertrophy after unilateral ovariectomy during the anestrus season in the ewe".  
*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 134: 237-240, 1970.
106. MARIANA, J.C.- "Some remarks on the long term trends and some short regulations in the follicular growth". En: IX Congreso Internacional de Reproducción Animal e Inseminación Artificial: Editorial Garsi, Madrid, 1980, vol. 2, p. 79-94.
107. MATTNER, P.E. y A.W.H. BRADEN.- "Secretion of oestradiol-17 $\beta$  by the ovine ovary during the luteal phase of the oestrous cycle in relation to ovulation".  
*J. Reprod. Fert.* 28: 136-137, 1972.

108. MAY, N.D.S.- "The anatomy of the sheep". Editorial University of Queensland Press. Queensland, 1954.
109. McEWEN, B.- "Steroid receptors in neuroendocrine tissues: Topography, subcellular distribution and functional implications". En: Subcellular Mechanisms in Reproductive Neuroendocrinology, Ed. por F. Naftoin; K. Ryan y J. Davies: Editorial Elsevier, Amsterdam, 1976, p. 277-304.
110. McCLELLAN, M.C.; M.A. DIECKMAN; J.H. ABEL (Jr) y G.D. NISWENDER.- "Luteinizing hormone, progesterone and the morphological development of normal and superovulated corpora lutea in sheep".  
*Cell. Tissue Res.* 164: 291-307, 1975.
111. McCLELLAN, M.C.; J.H. ABEL (Jr) y G.D. NISWENDER.- "Function of lysosomes during luteal regression in normally cycling - and PGF<sub>2α</sub> treated ewes".  
*Biol. Reprod.* 16: 499-512, 1977.
112. McCRAKEN, J.A.; D.T. BAIRD y J.R. GODING.- "Factors affecting the secretion of steroids from transplanted ovary of the -- sheep".  
*Recent. Prog. Horm. Res.* 27: 537-582, 1971.
113. MERK; F.B.; J.T. ALBRIGHT y C.D. BOTTICELLI.- "The fine structure of granulosa cell nexuses in rat ovarian follicles".  
*Anat. Rec.* 175: 107-126, 1973.
114. MIDGLEY, A.R.- "Immunoassay of FSH and LH".- En: Reproduction Research Information Service Ltd. Cambridge, England, 1972.

115. MILLER, B.G.- "RNA and protein metabolism in the ewe oviduct and endometrium at prooestrus: regulation by oestradiol and progesterone".  
*J. Endocr.* 69: 57-66, 1976.
116. MILLER, B.G.; L. MURPHY y G.M. STONE.- "Hormone receptor levels and hormone, RNA and protein metabolism in the genital tract during the oestrous cycle of the ewe".  
*J. Endocr.* 73: 91-98, 1977.
117. MOOR, R.M.- "Sites of steroid production in ovine graafian - follicles in culture".  
*J. Endocr.* 73: 143-150, 1977.
118. MOOR, R.M.- "Role of steroids in the maturation of ovine oocytes".  
*Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 18: 477-482, 1978.
119. MOOR, R.M.; L.E.A. ROWSON; M.F. HAY y B.V. CALDWELL.- "The corpus luteum of the sheep: effect of the conceptus on luteal function at several stages during pregnancy".  
*J. Endocr.* 43: 301-307, 1969a.
120. MOOR, R.M.; L.E.A. ROWSON; M.F. HAY y B.V. CALDWELL.- "The effect of exogenous gonadotrophins on the conceptus and corpus luteum in pregnant sheep".  
*J. Endocr.* 44: 495-499, 1969b.
121. MOOR, R.M.; M.F. HAY; R.V. SHORT y L.E.A. ROWSON.- "The corpus luteum of the sheep: effect of uterine removal during luteal regression".  
*J. Reprod. Fert.* 21: 319-326, 1970.

122. MOOR, R.M.; M.F. HAY; J.E.A. McINTOSH y B.V. CALDWELL.- "Effects of gonadotrophins on the production of steroids by -- sheep ovarian follicles cultured "in vitro"". *J. Endocr.* 58: 599-611, 1973.
123. MOOR, R.M.; M.F. HAY y R.F. SEAMARK.- "The sheep ovary, regulation of steroidogenic, haemodynamic and structural changes in the largest follicle and adjacent tissue before ovulation". *J. Reprod. Fert.* 45: 595-604, 1975.
124. MOOR, R.M. y N.W. BRUCE.- "The distribution of blood flow - to the reproductive tract of anaesthetized ewes near oestrus". *Acta Endocr.* 83: 794-799, 1976.
125. MOOR, R.M. y A.O. TROUNSON.- "Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes "in vitro" and - their subsequent developmental capacity". *J. Reprod. Fert.* 49: 101-109, 1977.
126. MOOR, R.M.; M.F. HAY; H.M. DOTT y D.G. CRAN.- "Macroscopic identification and steroidogenic function of atretic follicles in sheep". *J. Endocr.* 77: 309-318, 1978.
127. MOOR, R.M.; L.P. CAHILL y F. STEWART.- "Ovarian stimulation or egg production as a limiting factor of egg transfer". En: IX Congreso Internacional de Reproducción Animal e Inseminación Artificial: Editorial Garsi, Madrid, 1980, vol 1, p. 43-58.



128. MOORE, N.W.; S. BARRETT; J.B. BROWN; I. SCHINDLER; M.A. SMITH y B. SMYTH.- "Oestrogen and progesterone content of ovarian - vein blood of the ewe during the oestrous cycle".  
*J. Endocr.* 44: 55-62, 1969.
129. MOYLE, W.R.; G. ERICKSON; O.P. BAHL; S. CHRISTAKOS y J. GUTOWSKI.- " Action of PMSG and asialo-PMSG on rat Leydig and granulosa cells".  
*Am. J. Physiol.* 235: 218-226E, 1978.
130. NAAKTGEBOREN, C.; G.C. VAN DER WEYDEN; P.J. KLOPPER; C.H. - KROON; A.G. SCHOOF y M.A.M. TAVERNE.- "Electrophysiological observations of uterine motility during the oestrous cycle in sheep".  
*J. Reprod. Fert.* 35: 511-518, 1973.
131. NEWCOMB, R.; W.B. CHRISTIE; L.E.A. ROWSON; D.E. WALTERS y W. E.D. BOUSFIELD.- "Influence of dose repeated treatment and - batch of hormone on ovarian response in heifers treated with PMSG".  
*J. Reprod. Fert.* 56: 113-118, 1979.
132. NICKEL, R.; A. SCHUMMER y E. SEIFERLE.- "Lehrbuch der Anatomie der Haustiere III": Editorial Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg, 1976.
133. O'SHEA, J.D.- "The ultrastructure, origin and fate of the - theca externa of ovarian follicles in the sheep".  
*Res. Vet. Sci.* 14: 273-278, 1973.

134. O'SHEA, J.D.; D.G. CRAN; M.F. HAY y R.M. MOOR.- "Ultraestructure of the theca interna of ovarian follicles in sheep".  
*Cell. Tissue Res.* 187: 457-472, 1978a.
135. O'SHEA, J.D.; M.F. HAY y D.G. CRAN.- "Ultraestructural changes in the theca interna during follicular atresia in sheep".  
*J. Reprod. Fert.* 54: 183-187, 1978b.
136. OLDHAM, C.M.; Y. COGNIE; P. POINDRON y F. GAYERIE.- "The influence of progesterone or FGA priming on the ovarian function of seasonally anovular ewes induced to ovulate by their reintroduction to rams, teasing". En: IX Congreso Internacional de Reproducción Animal e Inseminación Artificial: Editorial Garsi, Madrid, 1980, vol. 3, p. 50 (resum.).
137. PANT, H.C.; C.R.N. HOPKINSON y R.J. FITZPATRICK.- "Concentration of oestradiol, progesterone, luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in the yugular venous plasma of ewes during the oestrous cycle".  
*J. Endocr.* 73: 247-255, 1977.
138. PEREZ GARCIA, T.- "La sincronización del estro en la oveja". En: VI Ciclo de Conferencias Técnicas. Ministerio de Agricultura. Dirección General de Ganadería, 1968a, vol. 1, p. 34.
139. PEREZ GARCIA, T.- "Sincronización del celo en la oveja e inducción a la gemelaridad". En: Semana Ibérica de Ganado lanar y sus Productos (Ponencia), Lisboa, 1968b, vol. 1, p. 27.
140. PEREZ GARCIA, T.- "Control Biológico de la Reproducción en la oveja de raza manchega (sincronización del celo)".  
*Rev. Patron. Biol. Anim.* 14: 285-337, 1970.

141. PEREZ GARCIA, T. y F. SAIZ CIDONCHA.- "Determinación de los niveles de progesterona plasmática para el estudio de la actividad ovárica en la oveja y para el diagnóstico de gestación en vaca y oveja". En: Simposium Internacional de Gado Ovino y Vacuno de Aptitud Cárnica, Zaragoza, 1979.
142. PEREZ y PEREZ, F.- "Fisiopatología de la reproducción animal". Ed. Científico Médica. Madrid, 1969.
143. PEXTON, J.E.; C.W. WEEMS y E.K. INSKEEP.- "Prostaglandins F in uterine venous plasma, ovarian arteria and venous plasma and in ovarian and luteal tissue of pregnant and nonpregnant ewes".  
*J. Anim. Sci.* 41: 154-159, 1975.
144. PIVKO, J. y P. MAJERCISK.- "Reaction of the sexual organs of heifers and gilts on PMSG/HCG stimulation". En: IX Congreso de Reproducción Animal e Inseminación Artificial: Editorial Garsi, Madrid, 1980, vol. 3, p. 25 (resum.).
145. PLOTKA, E.D.; R.E. ERB y R.B. HARRINGTON.- "Female sex steroid relationships during the oestrus cycle of the ewes".  
*J. Anim. Sci.* 30: 412-419, 1970.
146. PRATT, B.R.; R.L. BUTCHER y E.K. INSKEEP.- "Antiluteolytic - effect of the conceptus and PGE<sub>2</sub> in ewes".  
*J. Anim. Sci.* 46: 784-791, 1977.
147. PRATT, B.R.; R.L. BUTCHER y E.K. INSKEEP.- "Effect continuous intrauterine administration of Prostaglandin E<sub>2</sub> on life-span

of corpora lutea of nonpregnant ewes".

*J. Anim. Sci.* 48: 1441-1446, 1979.

148. PRUD'HOMME, M.J.; B. PELE; N. LACROIX; F. GAYERIE, Y. COGNIE y A. LOCATELLI.- "Electromyographic activity of the uterus in the ewe: comparison of normal oestrus and progestagens - induced oestrus during breeding season and during the seasonal anoestrus". En: IX Congreso Internacional de Reproducción Animal e Inseminación Artificial: Editorial Garsi, Madrid, 1980, vol. 3, p. 33 (resum.).
149. QUIRKE, J.F.; J.P. HANRAMAN y J.P. GOSLING.- "Plasma progesterone levels through the oestrus cycle and release of LH oestrus in the sheep with different ovulation rates".  
*J. Reprod. Fert.* 55: 37-44, 1979.
150. RADFORD, H.M. y A.L.C. WALLACE.- "Central nervous blockade of oestradiol stimulated release of luteinizing hormone in the ewe".  
*J. Endocr.* 60: 247-252, 1974.
151. RESTALL, B.J.- "Histological observations on the reproductive tract of the ewe".  
*Aus. J. Biol. Sci.* 19: 673-686, 1966.
152. REXROAD, C.E. y L.E. CASIDA.- "Ovarian follicular development in cows, sows and ewes in different stages of pregnancy as affected by number of corpora lutea in the same ovary".  
*J. Anim. Sci.* 41: 1090-1097, 1975.

153. REXROAD, C.E. y L.E. CASIDA.- "Effect of injection of progesterone into one ovary of PMSG treated anestrous ewes on follicle growth and ovarian estradiol  $17\beta$ ".  
*J. Anim. Sci.* 44: 84-88, 1977.
154. REXROAD, C.E. y C.R. BARB.- "Cervical mucus in estrous ewes after treatment with estrogen progestagens and intrauterine devices".  
*J. Anim. Sci.* 44: 102-105, 1977.
155. RICHARDS, J.S.; M.C. RAO y J.J. IRELAND.- "The actions of pituitary gonadotrophins on the ovary". En: Control of ovulation. Ed. por D.B. Crichton; G.R. Foxcroft; N.B. Haynes y G. E. Lamming: Editorial Butterworth, London, 1978, p. 197-216.
156. RIPPEL, R.H.; R.H. MOYER; E.S. JOHNSON y R.E. MAVER.- "Response of the ewe to synthetic gonadotropin releasing hormone".  
*J. Anim. Sci.* 38: 605-612, 1974.
157. ROBERTSON, H.A. y A.M. RAKHA.- "The sequence, time and duration, of the release of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in relation to oestrus and to ovulation in the sheep".  
*J. Endocr.* 35: 177-184, 1966.
158. ROBINSON, G.A.; R.W. BUTCHER y E. SUTHERLAND.- "Cyclic A.M. P.": Editorial Academic Press, New York, 1971.

159. ROBINSON, T.J.- "The synchronization of the oestrus cycle - and fertility". En: VI Congress International of Reproduc-- tion Animal and Insemination Artificial, París, 1968, vol. 2, p. 1347-1384.
160. RYAN, K.D. y D.L. FOSTER.- "Progesterone and LH patterns in the peripuberal ewe lamb". En: Proc. of the 11th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction. Carbondale, 1978, vol. 1L, p. 58, resum. 118.
161. SAIZ CIDONCHA, F.- "Puesta a punto de un sistema radioinmuno analítico rápido para determinaciones semicuantitativas de progesterona en plasma sanguíneo".  
*Ann. Inst. Nac. Inv. Agr.* 11: 109-122, 1980.
162. SARKAR, D.; S. CHIAPPA; G. FINK y N. SHERWOOD.- "GnRH surge in proestrous rats".  
*Nature*, 264: 461-463, 1976.
163. SCARAMUZZI, R.J.; B.V. CALDWELL y R.M. MOOR.- "Radioinmunoassay of LH and estrogen during the estrous cycle of the -- ewe".  
*Biol. Reprod.* 3: 110-119, 1970.
164. SCARAMUZZI, R.J. y D.T. BAIRD.- "Pulsatile release of luteinizing hormone and the secretion of ovarian steroids in sheep during anestrus".  
*Endocrinol.* 101: 1801-1806, 1977.
165. SEAMARK, R.F.; R.M. MOOR y J.E.A. McINTOSH.- "Steroid hormone production by sheep ovarian follicles cultured "in vitro"". *J. Reprod. Fert.* 41: 143-158, 1974.

166. SEAMARK, R.F.; F. AMATO; S. HENDRICKSON y R.M. MOOR.- "Oxygen uptake, glucose utilization, lactate release and adenine nucleotide content of sheep ovarian follicles in culture: effect of human chorionic gonadotrophin".  
*Aust. J. Biol. Sci.* 29: 557-563, 1976.
167. SEIDEL, G.E. y G.D. NISWENDER.- "Control of folliculogenesis and ovulation in domestic animals: puberal and adult function". En: IX Congreso Internacional de Reproducción Animal e Inseminación Artificial: Editorial Garsi, Madrid, 1980, - vol. 2, p. 11-16.
168. SHEMMESH, M.- "Progesterone cyclicity and the effect of the conceptus on plasma progesterone in cattle and sheep". En: IX Congreso Internacional de Reproducción Animal e Inseminación Artificial: Editorial Garsi, Madrid, 1980, vol. 2, p. 103-108.
169. SHERIDAN, P.J.; J.L. PHILLIPS; K.R. SIMMONS; J.L. CAFFREY; J.H. ABEL y G.D. NISWENDER.- "Modulation of the uptake and retention of estradiol-17 $\beta$  in the ovine corpus luteum by luteinizing hormone".  
*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 149: 537-540, 1975.
170. SIERRA ALFRANCA, I.- "Variaciones genéticas de parámetros fisiológicos". En: IX Congreso Internacional de Reproducción Animal e Inseminación Artificial: Editorial Garsi, Madrid, - 1980, vol. 1, p. 23-42.

171. SMITH, A.D.- "Storage and secretion of hormones".  
*Sci. Basis. Med.* 117: 74-101, 1972.
172. SMITH, J.F. "Ewe fertility production of cervical mucus".  
*J. Reprod. Fert.* 24: 132, (resum.), 1971.
173. SMITH, J.F. "Techniques and hazards of oestrus synchronization".  
*N. Z. Vet. J.* 24: 65-69, 1976.
174. SMITH, J.F. y T.J. ROBINSON.- "Luteal function in the merino ewe and the effect of exogenous progestagen".  
*J. Endocr.* 44: 79-89, 1969.
175. SMITH, J.F. y A.J. ALLISON.- "The effect of exogenous progestagen of the production of cervical mucus in the ewe".  
*J. Reprod. Fert.* 24: 279-283, 1971.
176. STABENFELDT, G.H.; J.A. HOLT y L.L. EWING.- "Peripheral plasma progesterone levels during the ovine estrous cycle".  
*Endocrinol.* 85: 11-15, 1969.
177. STABENFELDT, G.H.; D.P. NEELY; J.P. HUGHES y H. KINDAHL.- "Modification of uterine PGF<sub>2α</sub> in domestic animals through pathologic or pharmacology processes". En: IX Congreso Internacional de Reproducción Animal e Inseminación Artificial: Editorial Garsi, Madrid, 1980, vol. 2, p. 27-34.
178. STACY, B.D.; R.T. GEMMELL y G.D. THORBURN.- "Morphology of the corpus luteum in the sheep during regression induced by prostaglandin F<sub>2α</sub>".  
*Biol. Reprod.* 14: 280-291, 1976.



179. STAN, M.- "Oestrus synchronization in cattle by means of -- electric current". En: IX Congreso Internacional de Repro-- ducción Animal e Inseminación Artificial: Editorial Garsi, Madrid, 1980, vol. 3, p. 94 (resum.).
180. SZOLLOSI, D.- "Interaction between oocyte and follicle "in vivo"". En: IX Congreso Internacional de Reproducción Ani-- mal e Inseminación Artificial: Editorial Garsi, Madrid, 1980, vol. 2, p. 95-99.
181. TERQUI, M.; F. DRAY y J. COTTA.- "Variations de la concen-- tration de l'esradiol 17 $\beta$  dans le sang peripherique de la - Brebis au cours du cycle oestral".  
*C.R. Acad. Sc. (Paris)* 277 (D): 1795-1798, 1973.
182. THORBURN, G.D.; J.M. BASSET y I.D. SMITH.- "Progesterone con-- centration in the peripheral plasma of the sheep during the oestrous cycle".  
*J. Endocr.* 45: 459-469, 1969.
183. TSAKALOF, P.; N. VLACHOS y D. LATOUSAKIS.- "Observations on the reproductive performance of ewe lambs synchronized for oestrus".  
*Vet. Rec.* 100: 380-382, 1977.
184. TURGEON, J.L.- "Neural Control of ovulation".  
*Physiologist* 23 (3): 56-62, 1980.
185. TURNBULL, K.E.; A.W.H. BRADEN y P.E. MATTNER.- "The pattern of follicular growth and atresia in the ovine ovary".  
*Aust. J. Biol. Sci.* 30: 229-241, 1977.

186. WARNES, G.M.; R.M. MOOR y M.H. JOHNSON.- "Changes in protein synthesis during maturation of sheep oocytes "in vivo" and "in vitro".  
*J. Reprod. Fert.* 49: 331-335, 1977.
187. WHEELER, A.G.- "Comparisons of the ovulatory and steroidogenic activities of the left and right ovaries of the ewe".  
*J. Reprod. Fert.* 53: 27-30, 1978.
188. WILLEMSE, A.H.- "The secretory activity of the epithelium of the ampulla tubae in cyclic ewes: a light microscopical study".  
*Tijdschr Diergeneeskde* 100: 84-94, 1974.
189. WILLEMSE, A.H. y C.J. VAN VORSTENBOSCH.- "The secretory activity of the epithelium of the ampulla tubae in cyclic ewes: an electron microscopical study".  
*Tijdschr Diergeneeskde* 100: 95-105, 1974.
190. ZAMBONI, L.- "Fine morphology of the follicle wall and follicle cell-oocyte association".  
*Biol. Reprod.* 10: 125-149, 1974.
191. ZIMMERMAN, E.A.- "Localization of hypothalamic hormones by immunocytochemical techniques". En: *Frontiers in Neuroendocrinology*. Ed. por L. Martini y W. Ganong: Editorial Raven Press. 1976, vol. 4, p. 25-62.

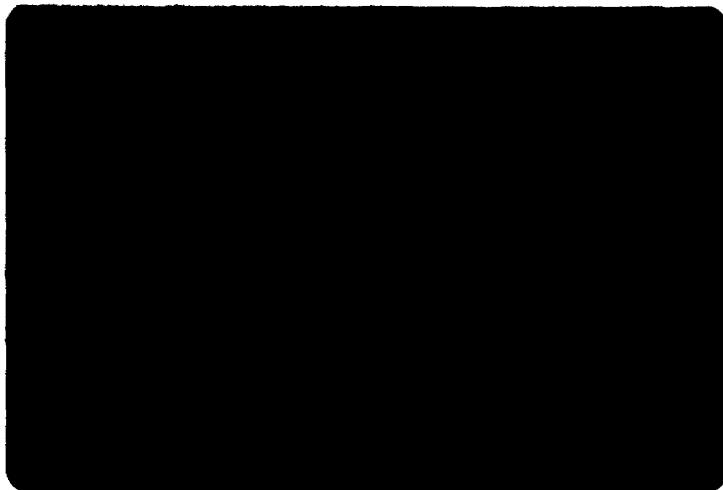
NOTA: Esta bibliografía se ha confeccionado siguiendo las normas señaladas por la American Physiological Society.



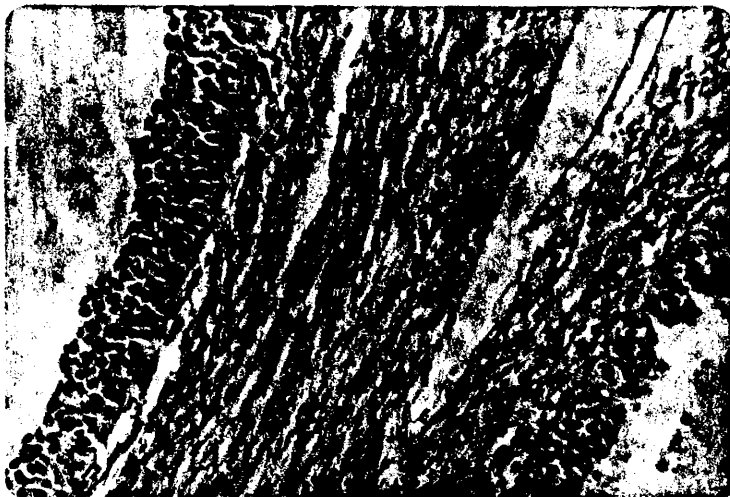
I



Nº 1 Folículo en vías de desarrollo



Nº 2 Estado mas avanzado

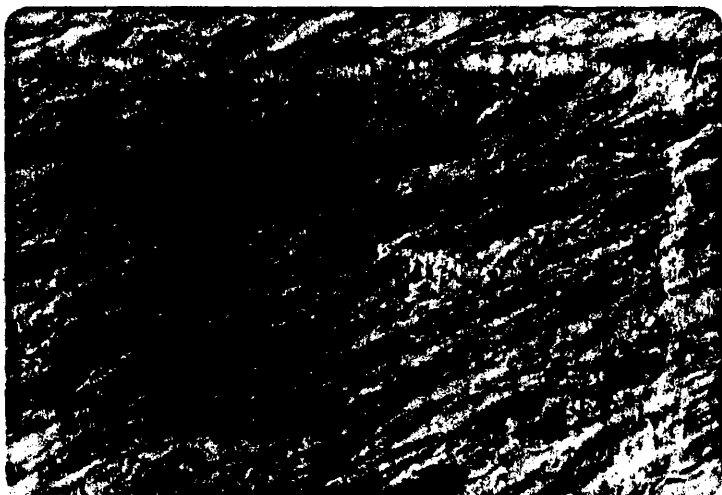


N° 3 Pared follicular

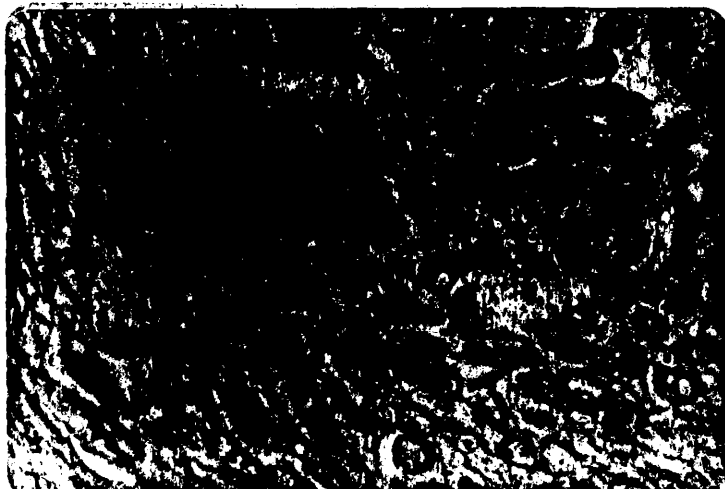


N° 4 Pared follicular

### III



N° 5, Detalle de la teca

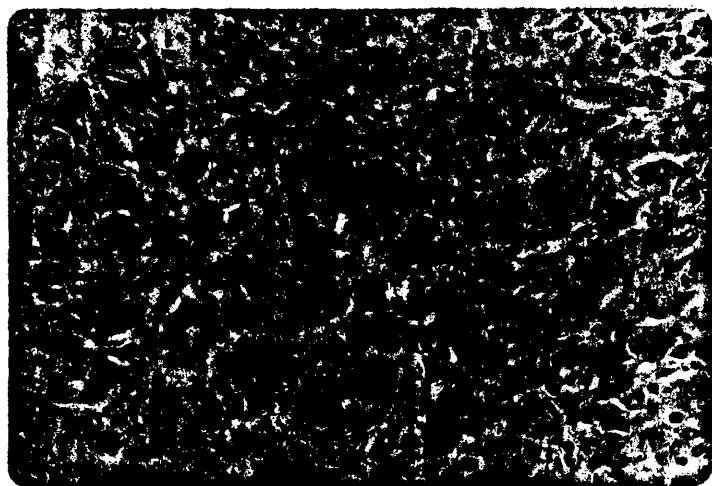


N° 6 Pared de folículo de Graaf

IV

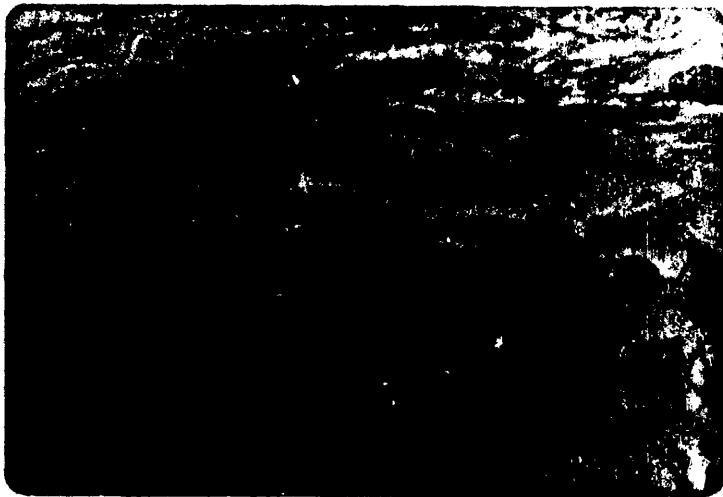


Nº 7 Cuerpo lúteo

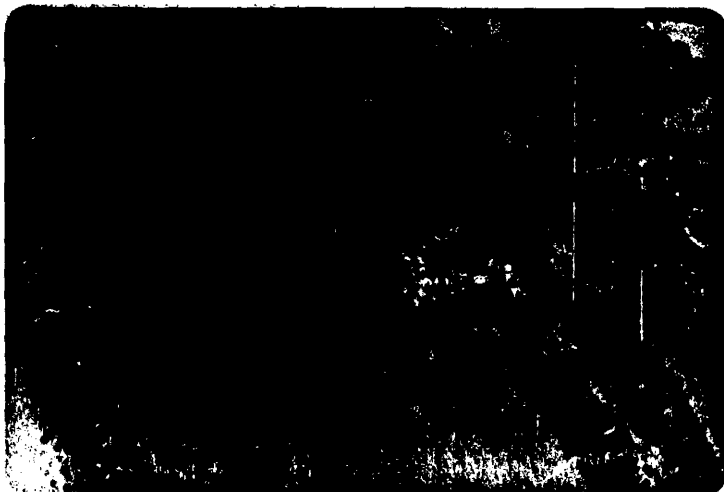


Nº 8 Cuerpo lúteo

V



N°9 Cuerpo lúteo



N°10 Oviducto



VI



N°11 Oviducto



N°12 Oviducto

VII

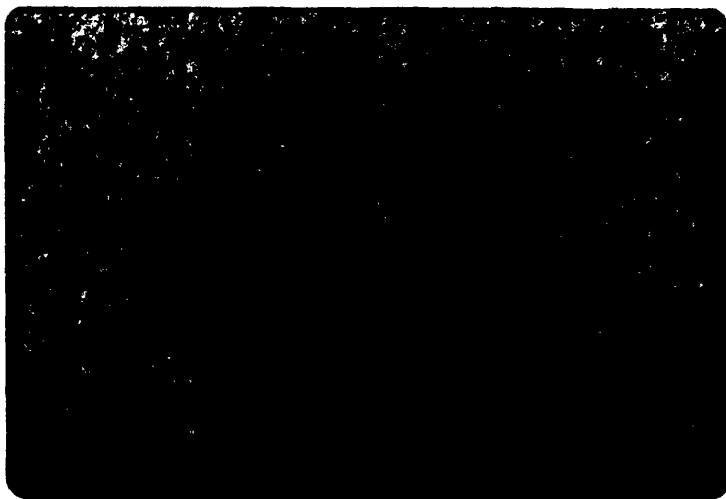


Nº 13 Endometrio



Nº 14 Glándulas endometriales

VIII



Nº 15 Glándulas endometriales



Nº 16 Cervix

